



Desenvolvimento de um biossensor para hemoglobina

ANA PATRÍCIA TAVARES MOREIRA

Junho de 2013



Desenvolvimento de um Biossensor para a Hemoglobina

Ana Patrícia Tavares Moreira

ORIENTADORES

Doutora Goretí Sales

Mestre Felismina Moreira

2013

Desenvolvimento de um Biossensor para a Hemoglobina

Ana Patrícia Tavares Moreira

*Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para a
obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica*

ORIENTADORES: Doutora Goretí Sales

Mestre Felismina Moreira

Agradecimentos

À doutora Goreti Sales por me ter recebido no Biomark e principalmente por toda a ajuda, disponibilidade, apoio e motivação que me deu desde o início.

À Felismina Moreira por toda ajuda, disponibilidade, apoio e motivação dados desde o início.

A toda a equipa do Biomark que me ajudou e apoiou desde o início.

À minha família, mãe, irmã, Rui Santos e avó Rosa por sempre acreditaram em mim e por me motivarem e apoiarem quando mais precisei.

Ao meu avô Manuel que apesar de já não estar cá sempre acreditou em mim.

Ao João Ribeiro e aos meus amigos que sempre me apoiaram e ajudaram.

Resumo

O presente trabalho descreve a preparação um anticorpo plástico (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*), i.e., de natureza sintética para detecção de hemoglobina (Hb) e sua aplicação na construção de dispositivos de pequena dimensão, portáteis, e de baixo custo, que possam ser usados em análises de rotina de Hb em *Point-of-Care* (POC).

O polímero impresso foi obtido por polimerização de superfície em esferas de sílica. Este processo foi iniciado pela ligação covalente da Hb às esferas, tendo-se permitido posteriormente a sua interação os monómeros carregados (cloridrato de metacrilato de 2-aminoetil, AEMH, e estireno sulfónico, (SSA), para subsequente polimerização com material neutro, como o estireno e divinilbenzeno (DVB). Por último, a Hb foi removida por clivagem de ligações peptídicas, através da atuação de proteinase K. Para controlo da eficiência da impressão da Hb no material sintético foi dimensionado um material análogo, obtido sem adição de proteína e aqui identificado por NIP (do inglês, *Non-Imprinted Polymer*). Para controlo do efeito dos monómeros carregados na afinidade de ligação entre a Hb e o seu anticorpo plástico, foram preparados materiais análogos onde o local de ligação foi dimensionado sem monómeros carregados.

Todos os materiais produzidos foram utilizados na preparação de sensores potenciométricos e comparados relativamente à sua afinidade e seletividade de ligação à Hb, por avaliação e comparação do desempenho analítico destes dispositivos. Os materiais NIP não foram capazes de gerar sinal analítico na presença de Hb, confirmando a existência de locais específicos para ligação desta proteína nos anticorpos plásticos MIP. O reconhecimento da estereoquímica da Hb foi confirmado pela ausência da capacidade de ligação dos materiais não-impressos, os Nipas, obtidos por impressão sem molécula molde. A análise por microscopia electrónica de varrimento confirmou a modificação da superfície das partículas de sílica.

O material bio mimético foi disperso em membranas seletivas PVC plastificado e usado na detecção de Hb na transdução potenciométrica. Algumas membranas apresentaram uma elevada afinidade para a Hb, adquirindo a sua cor vermelha após várias calibrações. A presença de Hb nestas membranas foi confirmada por remoção da membrana do corpo do eléctrodo e sua utilização em realização de estudos qualitativos com base em técnicas de Infravermelho com Transformada da Fourier, microscopia ótica e microscopia confocal de Raman.

As melhores características de resposta foram obtidas em tampão HEPES de pH 5, com as membranas MMA. Sob esta condição, os limites de detecção foram 43,8µg/mL, com uma

resposta linear a 83,8 $\mu\text{g/mL}$, com uma inclinação catiónico de 40,4 mV / década. A aplicação analítica foi realizada com sucesso e mostrou resultados exactos e precisos.

Palavras-chave: Impressão molecular em superfície; sensor; hemoglobina; potenciométrica; eléctrodos seletivos de ião.

Abstract

This work describes the preparation of Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) acting as antibodies of synthetic nature, for the detection of Haemoglobin (Hb) and its application in small, portable and low cost devices for routine use in Point-Of-Care (POC).

The imprinted polymer was created by surface imprinting technique on silica particles. Hb was first bound to the silica material and after arranged let arrange around charged monomers, 2-aminoethyl methacrylate hydrochloride (AEMH) and styrene sulfonic acid (SSA). A neutral surrounding environment was created around these by subsequent polymerization of Styrene and Divinylbenzene (DVB). Finally, the template was removed by imine cleavage after treatment with proteinase K. In order to control the efficiency of the imprinting process, a Non-Imprinted Polymer (NIP) was synthesized by the same way but without the template. The control of the effect of the charged monomers was followed by a polymer prepared similarly but without these charged monomers.

All materials were used to produce potentiometric sensors and compared with regard to their affinity and selectivity for Hb by evaluating their analytical. The NIP materials were unable to change the potential values of the device in different Hb concentrations, meaning that there were specific site for Hb binding created by means of its imprinting. The stereochemical recognition of Hb was confirmed by the non-rebinding ability displayed by non-imprinted (NIM) materials, obtained by imprinting without a template. SEM analysis confirmed the surface modification of the silica beads.

The biomimetic material was dispersed in plasticized PVC selective membranes and used as ionophores in potentiometric transduction of Hb. Some membranes showed a high affinity for Hb, retaining a red color in the selective membrane after calibration. The presence of Hb inside these membranes was confirmed by removing the membrane from the electrode body and proceeding with its qualitative analysis by means of Fourier transform infrared spectroscopy, optical microscopy and Raman confocal microscopy.

Good features were obtained in HEPES buffer of pH 5 with membranes MMA. Under this condition, the limits of detection were $43.8\mu\text{g/mL}$ for a linear response after $83.8\mu\text{g/mL}$ with a cationic slope of 40.4 mV/decade . The analytical application was conducted successfully and showed accurate and precise results.

Keywords: Surface molecular imprint; sensor; Hemoglobin; Potentiometry; Ion-selective electrodes.

Índice

1.	Introdução	1
1.1	Hemoglobina	1
1.2	Métodos de quantificação da Hemoglobina	2
1.2.1	Métodos Químicos/Físicos	3
1.2.2	Métodos Bioquímicos	4
1.3	Polímeros de impressão molecular.....	5
1.3.1	Impressão de proteínas	6
1.3.2	Síntese do MIP	7
1.3.3	Receptores sintéticos versus naturais	10
1.4	Biossensores	11
1.4.1	Biossensores enzimáticos	12
1.4.2	Immunossensores	13
1.4.3	Biossensores com anticorpos plásticos.....	13
1.5	Potenciometria.....	14
1.5.1	Eléctrodo de referência.....	15
1.5.2	Eléctrodos indicadores	15
1.5.3	Sensores Potenciométricos	18
1.6	Considerações teóricas sobre sensores pontenciométricos.....	18
1.6.1	Curvas de calibração	19
1.6.2	Tempo de resposta.....	20
1.6.3	Efeito de pH	21
1.6.4	Selectividade	21
2.	Descrição Experimental	24
2.1	Material e aparelhos utilizados.....	24

2.2	Reagentes	26
2.3	Preparação do sensor	26
2.4	Preparação de membranas	30
2.5	Preparação das soluções	31
2.6	Avaliação comparativa dos eléctrodos	31
2.7	Avaliação da seletividade dos eléctrodos.....	32
2.8	Análise da superfície	33
2.9	Análise de amostras.....	33
3.	Resultados e Discussão	34
3.1	Características Gerais de Funcionamento dos Sensores.....	34
3.1.1	Efeito do pH	35
3.1.2	Resumo do efeito pH.....	40
3.1.3	Tempo de resposta, tempo de vida e estabilidade	42
3.2	Análise da morfologia das membranas de PVC	43
3.3	Análise da superfície das partículas modificadas	45
3.4	Análise de superfície das membranas seletivas.....	47
3.5	Seletividade do sensor	50
3.6	Análise de amostras.....	50
4.	Conclusões	51
5.	Referências Bibliográficas	52

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Representação e dimensão do eritrócito e da hemoglobina que este contém.	2
Figura 1.2 - Processo de formação de polímeros de impressão molecular. a) : processo de síntese; b) : reconhecimento do composto impresso.	6
Figura 1.3 - Polimerização em <i>Bulk</i>	8
Figura 1.4 - Polimerização em superfície.....	9
Figura 1.5 - Mecanismo de resposta de umbiossensor baseado em MIPs.	12
Figura 1.6 - Célula eletroquímica utilizando a potenciometria com ESI de membrana.....	14
Figura 1.7 -Eléctrodo Selectivo de ião.	17
Figura 1.8 Curva de calibração característica de um eléctrodo selectivo de ião. (—••—): sem variação nítida de potencial com a variação da <i>actividade</i> (<i>a</i>) ou <i>concentração</i> (<i>c</i>); (••••): variação ligeira de potencial com a variação da <i>a</i> ou <i>c</i> , sem corresponder ao registo esperado na equação modificada de <i>Nernst-Nicolski</i> ; (—): variação linear da variação da <i>a</i> ou <i>c</i> , previsto na equação modificada de <i>Nernst-Nicolski</i> ; LD: limite de detecção, mol/L; LIRL: limite inferior de resposta linear, mol/L.	20
Figura 1.9 -Representação gráfica do tempo de resposta, $t (\Delta E / \Delta t)$	21
Figura 2.1 - Montagem utilizada na leitura potenciométrica, incluindo equipamento de medida e acessórios como agitador magnético e sistema de leitura múltipla e sequencial de vários ESIs.	25
Figura 2.2 - Fotografia do corpo do ESI construído no laboratório para este trabalho (A) e do eléctrodo de referência Ag/AgCl de proveniência comercial (B).....	25
Figura 2.3 - Preparação do MIP com monómeros carregados.	27
Figura 2.4 - Preparação do MIP sem monómeros carregados.....	28
Figura 2.5 - Preparação do NIP com monómeros carregados.	29
Figura 2.6 - Preparação do NIP sem monómeros carregados.	29
Figura 2.7 -Vista de topo das membranas nos suportes condutores.....	31
Figura 3.1 -Calibração com concentração de 5×10^{-5} de Hb em tampão HEPES pH 3,5.	36
Figura 3.2 -Calibração com concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ de Hb em tampão HEPES pH 3,5.....	37

Figura 3.3 -Calibração com concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ de Hb em tampão HEPES pH 3,5.....	38
Figura 3.4 -Calibração com concentração de 5×10^{-5} de Hb em tampão HEPES pH 5,0.	39
Figura 3.5 -Comparação das calibrações em pH 3,5 e pH 5.	42
Figura 3.6 - Membranas de PVC após seis calibrações.	43
Figura 3.7 -a) Morfologia da membrana MMA;b) Morfologia da membrana MA; c) Morfologia da membrana CAA.	44
Figura 3.8 -Morfologia da membrana baseada em NIP.	45
Figura 3.9 -Suporte utilizado para analisar as diferentes morfologias das partículas de sílica. .	45
Figura 3.10 -Partículas de sílica não modificadas, seu tamanho (esquerda) e diâmetro de poro (direita).	46
Figura 3.11 - Partículas de sílica modificadas com formato MIP, seu tamanho (esquerda) e diâmetro de poro (direita).	46
Figura 3.12 - Partículas de sílica modificadas com formato NIP, seu tamanho (esquerda) e diâmetro de poro (direita).	47
Figura 3.13 - Espectro de Raman de amostras de membranas selectivas MAA, que tinham estado em contacto com a Hb ou sem contacto (branco).....	48
Figura 3.14 - Espectros de FTIR/ATR para amostras de membrana de MAA, antes (branco) ou depois de contactar com a Hb, e a Hb propriamente dita.	49

Lista de Tabelas

- Tabela 1.1** Comparação das moléculas naturais utilizadas em sensores e MIP.**Erro! Marcador não definido.**
- Tabela 2.1** Membranas selectivas..... **Erro! Marcador não definido.**
- Tabela 3.1** -Composição das membranas selectivas de Hb em 105 mg de PVC e suas características potenciométricas em $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de tampão HEPES, pH 3,5.... 35
- Tabela 3.2** -Composição das membranas selectivas de Hb em 105 mg de PVC e suas características potenciométricas em $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de tampão HEPES, pH 5,0... 39
- Tabela 3.3** -Composição das membranas selectivas de Hb em 105 mg de PVC e suas características potenciométricas em $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de tampão HEPES, pH 6,0..... 40
- Tabela 3.4** -Composição da membrana dos sensores de Hb com 105 mg de PVC e as suas características potenciométricas em $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de HEPES, pH 3.5, 5.0, 6.0 e 9.0. 41

Lista de Abreviaturas

AdA	Aditivo aniónico
AdC	Aditivo catiónico
AEMH	Cloridrato de 2-aminoetil metacrilato
AA	Ácido L-ascórbico
APTES	3-Aminopropiltriétoxissilano
BPO	Peróxido de benzoílo
Crea	Creatinina
DVB	Divinylbenzene
EDAC	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI	Eléctrodo seletivo de ião
F.e.m.	Força electromotriz
Glu	Glucose
Hb	Hemoglobina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiétil)-1-piperazinoetanossulfónico
HPLC	<i>High performance Liquid Chromatography</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Límite de deteção
LIRL	Límite Inferior de Resposta Linear
Mio	Mioglobina
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>
NHS	<i>N</i> -hidroxissuccinimida
NIP	<i>Non-Imprinted Polymer</i>
oNFOE	2-Nitrofeniloctiléter
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
POC	<i>Point-of-Care</i>
PVC	Poli(cloreto de vinilo)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SSA	Ácido estireno sulfónico
THF	Tetrahidrofurano
TMTVS	<i>Tris</i> (2-metoxiétoxivinil)silano

1. Introdução

Neste capítulo são apresentados os vários aspectos teóricos que sustentam o trabalho realizado ao longo desta dissertação. Para este efeito, focam-se aspectos relacionados com a proteína que é alvo deste estudo, a hemoglobina (Hb), abordando-se genericamente a sua composição e importância. Numa fase posterior referem-se aos aspectos técnicos relevantes com o desenvolvimento de um biossensor para monitorização de Hb.

1.1 Hemoglobina

A Hb é um componente vital para o ser humano, estando presente no sangue em altas concentrações. Este componente integra os eritrócitos e tem como missão fundamental transportar o oxigénio (O_2) desde os órgãos respiratórios até aos tecidos periféricos e o dióxido de carbono (CO_2) desde os tecidos periféricos até os pulmões [1].

Do ponto de vista químico, a Hb é uma proteína globular de grande dimensão, com cerca de 64500 Dt. Combina quatro subunidades proteicas menores, duas cadeiras peptídicas α (141 resíduos de aminoácidos em cada uma) e duas β (146 resíduos de aminoácidos em cada uma), correspondendo a uma organização geral do tipo $\alpha_2\beta_2$. Cada uma destas quatro unidades apresenta um grupo heme central, de natureza não proteica e que coordena um átomo de ferro central. É o grupo heme o responsável pela cor vermelha da proteína (Figura 1.1).

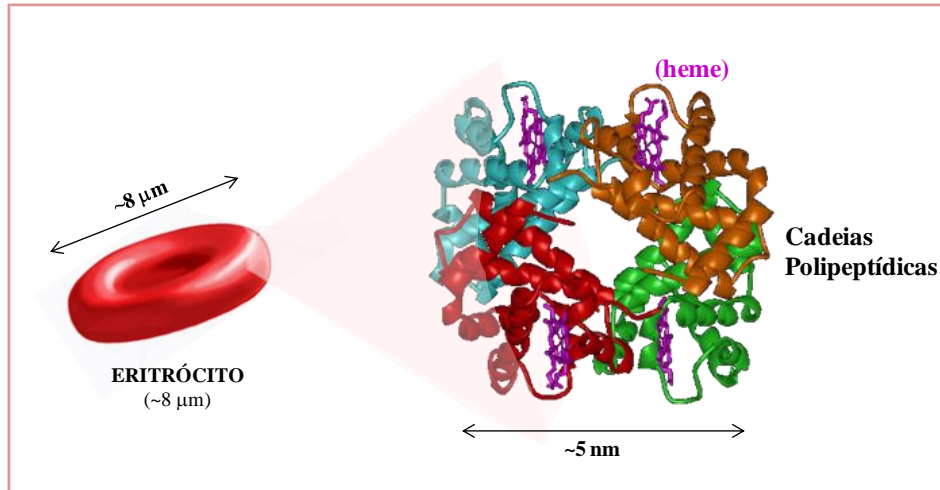


Figura 1.1 - Representação e dimensão do eritrócito e da hemoglobina que este contém.

Sendo a Hb um elemento vital, o organismo humano só terá saúde se a sua função estiver assegurada. Existem no entanto mais de 600 hemoglobinopatias descritas, sendo algumas destas capazes de causar doença grave, como, por exemplo, a talassemia. As hemoglobinopatias são defeitos hereditários que resultam na estrutura anormal das cadeias peptídicas que integram a hemoglobina [2,3]. Outras condições de doença associadas à Hb são, por exemplo, as anemias (baixa concentração de Hb no sangue), as doenças cardíacas e as doenças cancerígenas [4-6]. Estima-se que 40% de todos os pacientes com cancro sofrem de anemia no momento do diagnóstico e que cerca de 30 a 40% destes se tornam anémicos durante a evolução do tratamento [7-9].

O conhecimento dos níveis de Hb presentes no sangue é por isso de elevada importância, algo que tem motivado os investigadores a desenvolver métodos analíticos para este efeito.

1.2 Métodos de quantificação da Hemoglobina

Actualmente existem vários métodos disponíveis para determinar a Hb em amostras biológicas. De uma forma geral, estes métodos podem ser distinguidos entre métodos químicos/físicos ou bioquímicos. Os primeiros podem envolver alteração química/física imposta ao sistema de medida, enquanto os últimos envolvem reações com biomoléculas que apresentam atividade dirigida a um determinado alvo, como é o caso da actuação catalítica de enzimas ou da reacção de afinidade entre anticorpo e antígeno.

1.2.1 Métodos Químicos/Físicos

De uma forma geral, os métodos químicos/físicos baseiam-se em técnicas óticas, separativas e/ou electroanalíticas. As técnicas óticas são aquelas que envolvem interação da matéria com a radiação eletromagnética, desde os raios gama às ondas rádio, dando origem a fenómenos de emissão, absorção, dispersão, refração, reflexão, difração e polarização, que podem ser usados com fins qualitativos e/ou quantitativos.

No caso concreto da determinação de Hb, encontram-se descritos na literatura métodos baseados em fluorimetria [10,11], em dicroísmo circular [12] e em colorimetria [13]. Estas técnicas apresentam genericamente limitações do ponto de vista mais técnico da sua aplicação, uma vez que a presença de algum pigmento de outra cor pode causar interferência na quantificação e/ou deteção de Hb. Esta questão coloca-se sobretudo na determinação de vestígios de Hb em fluidos biológicos onde esta não se deveria encontrar, como por exemplo, urina. Existe ainda uma determinação direta de Hb em superfície sólida, baseada em *UV-VIS* por refletância difusa [14].

No que diz respeito aos métodos separativos, estes visam separar os constituintes de interesse ou o interferente da amostra antes de efectuar a sua quantificação. Para se conseguir uma separação, deve haver pelo menos uma diferença significativa entre a substância química ou propriedades físicas da substância a analisar e a interferente [15]. São descritos na literatura diversos trabalhos que recorrem ao uso de técnicas separativas para determinar a Hb, como a eletroforese [16,17] e a *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) [18,19]. Estes métodos são habitualmente muito selectivos, porque pressupõe uma separação do analito dos restantes elementos da matriz, antes da sua quantificação propriamente dita. No entanto, são muito pouco expeditos e envolvem instrumentação robusta que não pode ser levada até ao local da análise ou da recolha de amostra, para a análise subsequente em *Point-of-Care* (POC).

Por fim, os métodos electroanalíticos utilizam uma propriedade de natureza eléctrica para obter informação sobre a solução em estudo, muitas vezes em quantidades vestigiais [20]. Estes métodos são considerados poderosos e versáteis, pois oferecem alta sensibilidade, elevada precisão e alargada gama de resposta linear, recorrendo a instrumentação de baixo custo [21,22]. Para além disso, não necessitam de grandes volumes de amostra e os tempos de análise são relativamente curtos quando comparado com outros métodos [23]. Existem alguns métodos descritos na literatura para determinação da Hb com base em técnicas electroanalíticas, como a voltamétrica [24]. Este trabalho baseia-se na medição dos picos de oxidação/redução do metal de Ferro presente na Hb. De modo análogo, um trabalho amperométrico é baseado na reacção redox entre o ferro presente na hemoglobina e peróxido de hidrogénio adicionado externamente

[25]. Neste sentido, estes trabalhos (voltamétrico e amperométrico) não podem ser aplicados à análise de amostras que apresentem outras fontes de ferro para além da própria proteína.

1.2.2 Métodos Bioquímicos

São poucos os métodos bioquímicos descritos na literatura baseados na actuação catalítica de enzimas. Um exemplo destes é o trabalho polarográfico, de natureza eléctrica, descrito em [26]. Este trabalho recorre à actuação enzimática para promover a reacção entre a Hb, a *O*-Fenildiamina e o H₂O₂, com medicação subsequente do produto resultante da mesma, o 2,2'-Diaminoazobenzeno. Apesar da selectividade do sistema enzimático associado, este método sofre interferências provenientes de proteínas do soro.

A grande parte dos métodos de natureza bioquímica baseia-se na reacção de afinidade entre anticorpo e antígeno, cuja transdução pode recorrer às técnicas indicadas anteriormente para os métodos químicos/físicos: óticas, separativas e/ou electroanalíticas. Os métodos mais referidos na literatura para este efeito incluem ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) [27-30], radioimunoensaio (RIA, do inglês *Radioimmunoassay*) [31-35], imunocromatografia [36] e ressonância de *plasmon* de superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*) [37-39]. Estes trabalhos são no geral muito selectivos porque se baseiam na interacção biológica anticorpo/antígeno, embora a sua selectividade efectiva dependa do grau de afinidade entre a Hb e o anticorpo utilizado. O recurso a anticorpos pressupõe, porém, metodologias com estabilidade reduzida, tempos de resposta elevados e uma impossibilidade de reutilização dos materiais biológicos, umas que a ligação anticorpo/antígeno é de natureza irreversível. O elevado custo destes materiais biológicos inviabiliza também a sua utilização em programas de rastreio ou em medições de rotina praticadas nos hospitais.

De uma forma geral, as reacções bioquímicas utilizadas nestes métodos apresentam elevada selectividade mas impõem limitações severas ao manuseamento dos reagentes e condições de operação, dando origem a sistemas com tempos de vida muito reduzidos, da ordem dos vários dias. Em geral, estas restrições podem ser evitadas através da substituição dos anticorpos naturais por recetores artificiais, também reconhecidos como biomiméticos e obtidos comumente por técnicas de impressão molecular [40] [41]

1.3 Polímeros de impressão molecular

O conceito de impressão molecular surge a partir da teoria de Pauling para formação de anticorpos [42]. 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 [43]. Desde então, a sociedade tem assistido a uma grande evolução científica neste domínio, dada a grande atenção que a técnica de impressão molecular tem despertado na área dos (bio)materiais, em resultado da elevada selectividade demonstrada para várias moléculas alvo [44].

A impressão molecular é uma técnica que consiste na impressão de uma determinada molécula, que serve de molde, numa estrutura rígida tridimensional. Apresenta-se na Figura 1.2 a) um esquema geral relativo à sua obtenção. Numa primeira fase, a molécula molde interage com as moléculas de um monómero, por meio de uma ligação covalente ou não covalente. Depois, é adicionado ao meio um agente reaccional que promove ligações cruzadas entre as moléculas do monómero, assim como o crescimento polimérico que resulta na formação de uma matriz sólida rígida. A reacção de polimerização inicia-se após a adição de um iniciador, sendo tipicamente de natureza radicalar. No final, essa molécula é removida sem que a geometria dessa estrutura seja alterada, originando assim um polímero de impressão molecular (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*). A remoção do molde deixa no polímero locais com forma específica e complementaridade dos grupos funcionais da molécula molde.

O MIP obtido permite efectuar o reconhecimento da molécula removida, pois dispõe de cavidades com tamanhos e formas complementares a essa molécula, mantendo assim a capacidade de reter selectivamente essa mesma molécula presente numa amostra, como é possível visualizar na Figura 1.2 b). De uma forma geral, os materiais poliméricos MIP apresentam em geral elevada afinidade e selectividade para a molécula de interesse [41,45], voltando a ligar-se à estrutura rígida nos mesmo locais de onde foram removidos (Figura 1.2 b)). Essa afinidade e força de ligação entre MIP e a sua molécula molde depende, no entanto, de todos os factores associados ao processo de dimensionamento do polímero e da molécula molde propriamente dita.

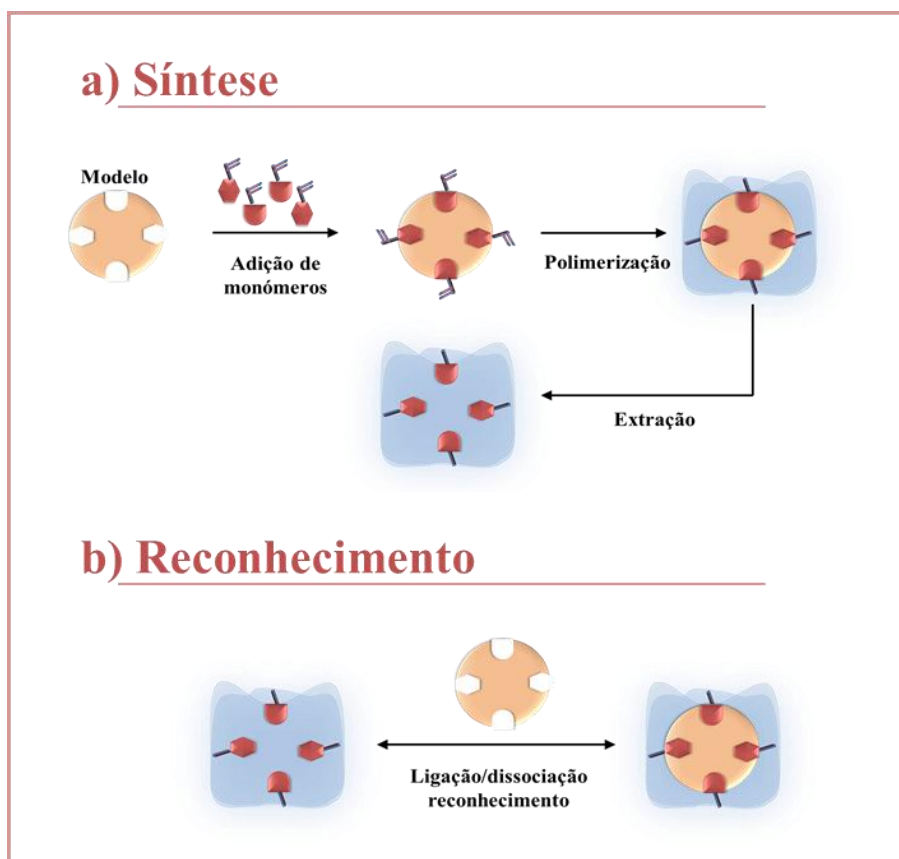


Figura 1.2 - Processo de formação de polímeros de impressão molecular. **a)**: processo de síntese; **b)**: reconhecimento do composto impresso.

Ao longo das últimas décadas, foi possível efectuar com sucesso a impressão molecular para um conjunto muito diverso de compostos, como antibióticos, pesticidas, etc. [46,47]. As estruturas molde que têm oferecido maiores dificuldades à estratégia de impressão molecular são as proteínas, mas a grande importância destes compostos na manutenção da vida, associada à necessidade premente de substituir os anticorpos naturais nos seus métodos de análise por análogos sintéticos, faz com que seja fundamental prosseguir com a sua impressão [48,49].

1.3.1 Impressão de proteínas

A impressão molecular de proteínas consiste em várias etapas consecutivas, que normalmente incluem a ligação de um modelo, a desnaturação da proteína e a remoção do molde, para a sua subsequente ligação aos *binding sites* formados. Esta ligação conta com interações electrostáticas entre os grupos funcionais na superfície externa da proteína e os grupos presentes nas cavidades de reconhecimento, tais como ligações de hidrogénio, forças de Van der Waals, ligações iónicas e interações hidrófobas. Os grandes pontos críticos no

processo de impressão de proteínas relacionam-se com a elevada flexibilidade estrutural do composto molde, uma característica que é condição essencial à sua função biológica, e com sua elevada dimensão.

Do ponto de vista espacial, o modelo impresso na matriz rígida deve corresponder à forma do composto que se pretende reconhecer posteriormente. Porém, as proteínas são estruturas de grande dimensão, cuja disposição 3D depende de inúmeros fatores, como pH, temperatura e natureza do solvente [50,51,52]. Para assegurar uma correspondência entre o molde e a estrutura impressa, as condições da sua impressão molecular devem ser, tanto quanto possível, análogas às que se encontram em ambiente fisiológico [48,53,54].

As proteínas são estruturas de grande dimensão, podendo chegar a ~10 nanómetros. Esta grande dimensão impõe restrições na acessibilidade aos locais de ligação complementares, estando dificultados os movimentos de difusão de entrada e saída da proteína desses locais de ligação.

Apesar de todas estas dificuldades associadas à impressão de proteínas, são vários os métodos descritos na literatura para este efeito, passando-se a descrever de seguida aqueles mais comuns.

1.3.2 Síntese do MIP

Os MIPs para proteínas podem considerar a impressão de toda a proteína ou de apenas parte dela [49], recorrendo-se para isso à abordagem convencional de impressão em *Bulk* ou a técnicas mais sofisticadas de impressão em superfície.

1.3.2.1 Polimerização em Bulk

A abordagem mais habitualmente utilizada para produzir MIPs é a de polimerização em *Bulk*, uma vez que esta permite obter grandes quantidades de material bio mimético. Neste tipo de polimerização os monómeros funcionais estão ligados por meio covalente ou não covalente a uma molécula que é utilizada como molde. O posicionamento correcto destes grupos funcionais permite a sua convergência para a molécula molde de uma forma recíproca.

Tipicamente, a reacção de polimerização é iniciada na presença de quantidades iguais de um solvente inerte e um iniciador de radical livre. Na maioria dos casos, a remoção do molde é feita por extracção ou por hidrólise, deixando locais complementares em tamanho e forma da molécula molde. O polímero resultante é, então, pulverizado e peneirado, de modo a produzir partículas de receptores impressos de tamanho apropriado (Figura 1.3) [55,56].

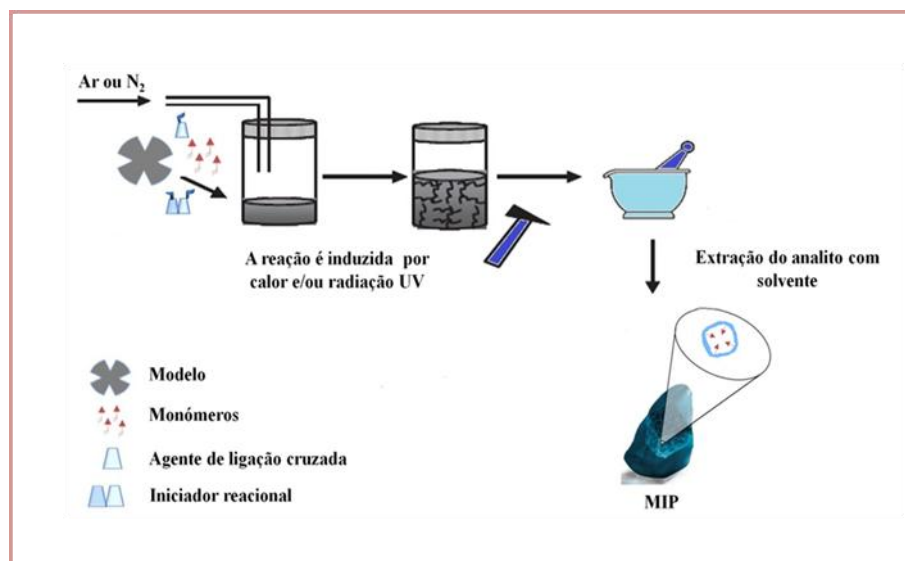


Figura 1.3 - Polimerização em *Bulk*.

Este método é o mais popular, uma vez que é simples, no entanto, o processo para obter o tamanho de partículas apropriado é demorado e muitas vezes produz partículas que são irregulares em forma e tamanho. Para além disso, alguns locais de interacção são destruídos durante a moagem, o que reduz o desempenho do material [56]. Devido à complexidade geométrica e química das proteínas, a impressão molecular em *Bulk* apresenta características de transferência de massa reduzidas e possibilidade de imobilização permanente da molécula molde no polímero e de baixa integridade da estrutura polimérica resultante. Para além disso, a escolha do solvente é restrita e os locais de ligação obtidos podem apresentar alguma heterogeneidade [57,58]. Para colmatar algumas destas lacunas, surge a impressão molecular em superfície.

1.3.2.2 Polimerização em Superfície

A impressão molecular em superfície é a técnica mais comum utilizada para impressão de proteínas e é adequada para fins analíticos devido à sua elevada percentagem de eficiência na reocupação dos locais de ligação com moléculas alvo [59]. O processo geral encontra-se representado na Figura 1.4.

A característica mais relevante neste tipo de impressão molecular é a de que os locais de ligação da molécula molde ficam localizados à superfície de uma estrutura rígida de suporte. Os processos de impressão polimérica utilizados recorrem às mesmas técnicas de polimerização

usadas na impressão em *Bulk*, mas a molécula molde deve estar ligada, de modo covalente ou não, a um substrato plano ou esférico [49,54].

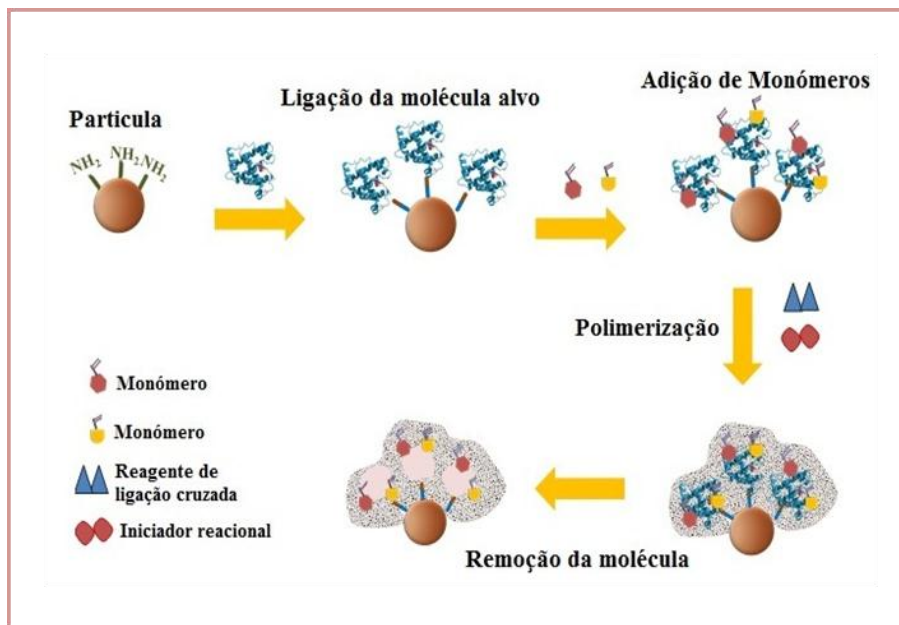


Figura 1.4 - Polimerização em superfície.

Esta técnica oferece inúmeras vantagens relativamente à impressão em *Bulk* de proteínas, tais como apresentar uma maior percentagem de reocupação dos locais de recepção, uma resposta mais rápida, uma alta selectividade e sensibilidade, maior simplicidade de preparação, alta reprodutibilidade, e rápida transferência de massa. Além disso, a preparação deste tipo de MIP é mais rentável, porque a quantidade de moléculas molde necessárias é muito menor [51,56]. Este é um aspecto de substancial importância quando se pretende imprimir proteínas, já que estas são comercializadas apenas em quantidades muito reduzidas e com elevado custo.

De uma forma geral, a polimerização em superfície caracteriza-se por apresentar locais de ligação na superfície da matriz polimérica, havendo uma reduzida probabilidade do aprisionamento da proteína, aquando da sua preparação, no interior do polímero e a molécula molde tem mais facilidade na reocupação desses locais [53]. A impressão em superfície é hoje a forma mais prática e corrente de produzir materiais cujo desempenho se pretende que seja análogo ao dos anticorpos naturais.

1.3.3 Receptores sintéticos versus naturais

Os materiais MIPs surgem na sequência da necessidade de criar receptores artificiais com propriedades semelhantes ou superiores, às dos receptores naturais [60]. O tipo de interacção mais frequente e de maior importância neste contexto é aquela do antígeno-anticorpo.

A tabela 1.1 pretende comparar o desempenho MIPs com o dos anticorpos naturais utilizados em sensores, deixando antever algumas vantagens decorrentes da utilização desses materiais sintéticos

Tabela 1. 1 – Comparação das moléculas naturais utilizadas em sensores e MIP.

<i>Características</i>	<i>Anticorpos</i>	<i>MIP</i>
Afinidade de ligação	Alta afinidade / especificidade	Varia (especialmente para modelos macromoleculares)
Generalidade	Um recetor por analito	Podem ser preparados praticamente para qualquer composto
Robustez	Estabilidade limitada (cada elemento tem requisitos operacionais próprios)	Estável numa variedade de condições (pH, temperatura, força iónica, solvente)
Custo	Preço elevado	Baixo custo
Armazenamento	Dias à temperatura ambiente	Armazenamento a longo prazo, sem perda de performance (vários meses a anos)
Síntese/Preparação	Preparação demorosa	Fácil preparação
Integração de sensores	Fraca compatibilidade com superfícies de transdutores	Totalmente compatível
Infra-estruturas	Instrumentos analíticos caros / mão-de-obra qualificada	Deteção livre de rótulo

. De uma forma geral, os receptores biológicos naturais são tipicamente mais selectivos do que os seus análogos sintéticos, mas apresentam elevada instabilidade química, requisitos especiais de manuseamento e armazenagem, além de serem extremamente dispendiosos. Por outro lado, o reconhecimento molecular baseado na impressão molecular apresenta afinidades de ligação aceitáveis com as moléculas alvo, mas que na sua grande maioria são de menor intensidade/selectividade do que a verificada com materiais receptores de origem natural. A maior aplicação geral dos MIPs ao longo dos tempos tem sido em processos separativos, como

isolamento, extracção, ou purificação de proteínas, já que nestes casos essa menor afinidade/selectividade não tem implicações significativas do ponto de vista analítico [49].

No entanto, nesta última década têm surgido pequenas alterações estratégicas no processo geral de impressão que conduziram à produção de MIPs com melhores características de selectividade, aproximando-os cada vez mais dos seus receptores naturais. É neste contexto de melhoria que têm surgido inúmeros trabalhos na literatura que aplicam estes materiais biomiméticos na substituição de anticorpos usados em biossensores. [44,50,61].

1.4 Biossensores

Um biossensor é um pequeno dispositivo analítico que combina um componente biológico com um componente físico-químico, o transdutor, transformando a informação (bio)química num sinal de medida (Figura 1.5). No global, um biossensor combina a especificidade dos processos de reconhecimento biológico com as várias técnicas de detecção, que podem ser de natureza óptica e/ou eléctrica.

O principal objectivo do processo de reconhecimento biológico é proporcionar ao sensor um elevado grau de seletividade para o analito a ser medido. Neste processo, estes sensores podem ser definidos como dispositivos biocatalíticos, utilizando componentes biológicos imobilizados, como enzimas, células ou tecidos e sensores de afinidade, com base em anticorpos, receptores de membrana ou ácidos nucleicos.

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o mecanismo que confere a especificidade biológica, ou pelo modo de transdução do sinal ou, em alternativa, uma combinação dos dois [50,61,62]. Os mais comuns para proteínas usam anticorpos como componente biológico, tomando a designação geral de imunossensores, havendo também alguns imunossensores baseados em enzimas.

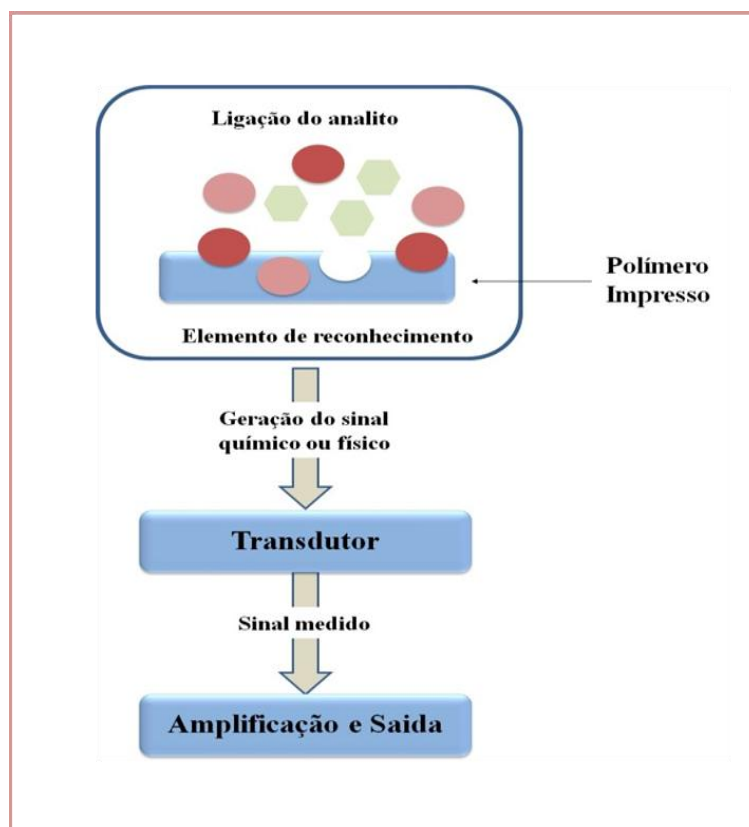


Figura 1.5 - Mecanismo de resposta de um biossensor baseado em MIPs.

1.4.1 Biossensores enzimáticos

Os biossensores enzimáticos consistem num instrumento analítico que combinam a enzima como material biológico com um transdutor. A enzima é habitualmente utilizada no contexto dos biossensores pela sua atividade catalítica. Esta pode actuar diretamente sobre o analito (neste substrato típico da enzima no biossensor) ou indiretamente, por meio de reacção com algum produto ou reagente que promova uma alteração de sinal no transdutor. As enzimas podem também ser usadas como marcadores ligados a anticorpos, antígenos e oligonucleótidos com uma sequência específica, proporcionando assim sensores baseados em afinidade [63].

As enzimas têm sido também utilizadas como catalisadores de reacções orgânicas que decorrem em solventes orgânicos. As reacções catalisadas por enzimas neste meio orgânico apresentam geralmente algumas desvantagens, tais como a reduzida solubilidade dos reagentes e produtos em meios biológicos e a grande dificuldade em recuperar as enzimas a partir de sistemas de reacção e reacções secundárias indesejadas. Além disso, a actividade catalítica das enzimas em solventes orgânicos está muito enfraquecida, por vários factores como a formação

de ligações fracas entre o substrato e a enzima, pH desfavorável e reduzida mobilidade conformacional [64]. Estas desvantagens justificam que a maioria dos biossensores com recetores biológicos recorra a anticorpos.

1.4.2 Imunossensores

Os imunossensores consistem em dispositivos no qual a reação imunoquímica é acoplada a um transdutor. A base fundamental do imunossensor é a especificidade do reconhecimento molecular de antígeno por meio de anticorpos para formar um complexo estável, sendo semelhante à metodologia de imunoensaio [65]. A formação deste complexo tem de ser detectada em condições nas quais as interações não específicas são minimizadas, sendo que cada determinação do antígeno exige a produção de um anticorpo, nomeadamente o seu isolamento, e, geralmente, a sua purificação.

A fim de aumentar a sensibilidade deste tipo de sensores, o recurso a marcadores enzimáticos acoplados ao antígeno ou anticorpo é uma prática corrente, exigindo passos adicionais de síntese química. Mesmo no caso de o anticorpo estar marcado com uma enzima, estes biossensores funcionam essencialmente no estado de equilíbrio, sendo a actividade enzimática usada não só para quantificar a quantidade de complexo produzido [62].

Os sinais produzidos por imunossensores podem ser reconhecidos/transduzidos por técnicas de natureza eléctrica, ótica, e/ou microgravimétrica. Na literatura é possível encontrar a descrição de várias técnicas eléctricas para a monitorização da formação do complexo antígeno - anticorpo em imunossensores de Hb, tais como Potenciometria [66], *Ion-Selective Field Effect Transistors* (ISFETs) [67], Electroquímica[68] e *Field Effect Transistor* (FET) [69].

Os dispositivos que usam materiais MIP são uma aproximação aos imunossensores, medindo a quantidade da molécula molde adsorvida por estes materiais [50].

1.4.3 Biossensores com anticorpos plásticos

Uma alternativa aos anticorpos naturais em imunoensaios é substituí-los pelos seus análogos sintéticos, baseados em materiais MIP [46]. Até à presente dada, não se encontram na literatura biossensores para Hb baseados em MIPs.

1.5 Potenciometria

A potenciometria é uma técnica eletroanalítica, que consiste na diferença de potencial entre o eléctrodo indicador e o de referência numa célula electroquímica, em condições onde não ocorra transferência electrónica (corrente zero). Essa diferença de potencial resultante, no caso de um eléctrodo selectivo de iões (ESI), é linearmente dependente do logaritmo da actividade de um dado ião em solução [70]. O principal objectivo é obter informação sobre a variação da concentração do analito ($[A]$), durante a adição deste a uma solução que possui um determinado pH (Figura 1.6).

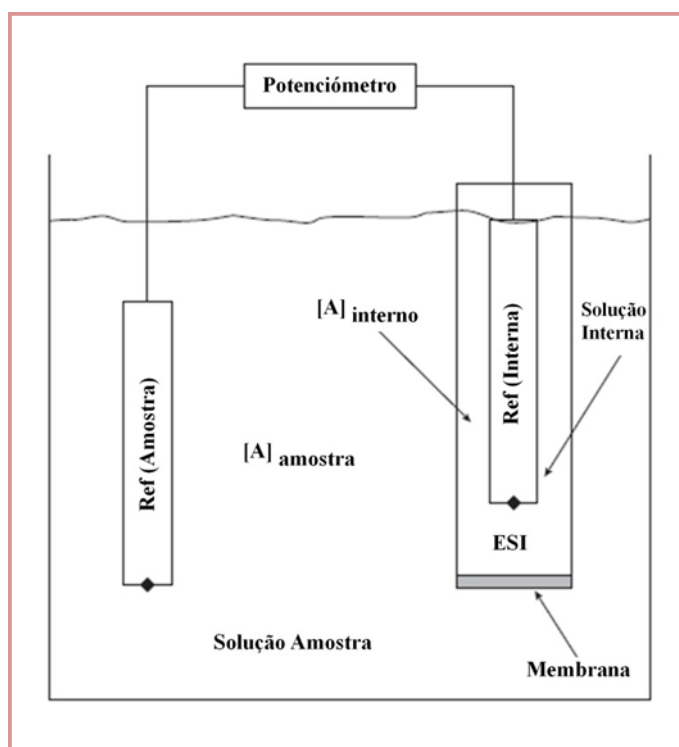


Figura 1.6 - Célula eletroquímica utilizando a potenciometria com ESI de membrana.

A medida potenciométrica mais corrente é a medida de pH, que em tempos foi a única medida desta natureza que teria lugar dentro de um laboratório químico. Nos anos sessenta, a maior parte dos laboratórios utilizavam esta técnica recorrendo a eléctrodos metálicos, cujo metal era revestido por sais não solúveis, e eléctrodos de vidro na medição do pH. As características destes eléctrodos não eram, contudo, satisfatórias, pois apresentavam falta de reprodutibilidade e de estabilidade, assim como resposta demorada.

Com a evolução da tecnologia, os eléctrodos e os equipamentos de medida evoluíram, conduzindo a um aumento significativo da qualidade dos dispositivos e dos equipamentos, permitindo responder seletivamente ao analito em estudo presente em solução [71]. Estes eléctrodos podem ser, hoje, dispositivos portáteis e de baixo custo que permitem a detecção das actividades iónicas em meios aquosos apresentando uma resposta simples, directa, selectiva, exacta e precisa em relação ao consumo de reagentes e equipamentos envolvidos [70]. A detecção de uma espécie por potenciometria pressupõe sempre a presença de eléctrodos de referência e indicador [51].

1.5.1 Eléctrodo de referência

Os eléctrodos de referência são utilizados como factor de comparação do eléctrodo indicador, e por este motivo, estes apresentam um potencial constante e estável em função do tempo, independentemente das propriedades da solução na qual se encontram imerso. O eléctrodo de referência é considerado ideal se apresentar as seguintes características:

- potencial constante durante a análise;
- reversível e obedece a equação de Nernst;
- fácil preparação e construção;
- baixa histerese, ou seja, o potencial do eléctrodo deve responder a uma variação de temperatura, retomando o valor inicial do potencial assim que a temperatura inicial é restabelecida;
- baixa polarizabilidade, ou seja, devem manter o potencial, independentemente da corrente que passe pelo eléctrodo.

Os eléctrodos de referência utilizados em métodos de potenciométricos são os eléctrodos de calomelanos, os de cloreto de prata/prata, os de padrão de hidrogénio, e os de talamina. Os de cloreto de prata/prata são os eléctrodos de referência mais utilizados devido à sua fácil preparação e também pelo facto de manter o seu potencial constante. Estes são constituídos por um fio de prata recoberto por cloreto de prata em contacto com uma solução de KCl. O potencial fornecido por este eléctrodo depende da concentração de cloreto nesta solução [72].

1.5.2 Eléctrodos indicadores

Para que estejam criadas as condições necessárias para se medir a força eletromotriz (f.e.m) de uma célula, é preciso associar o eléctrodo indicador, através de uma ponte salina ao eléctrodo

de referência. Esta necessidade de associação deve-se à impossibilidade de medir o potencial do eléctrodo indicador de forma directa.

Os eléctrodos indicadores são sensíveis à espécie a ser determinada e quando submersos numa solução interagem com a espécie de interesse, desenvolvendo um potencial que reflecte a função da concentração dessa espécie. O eléctrodo indicador é considerado ideal se apresentar as seguintes características:

- alto grau de reprodutibilidade;
- responder de maneira selectiva a uma determinada espécie de interesse;
- responder à variação de concentração da espécie em estudo de forma rápida.

Estes eléctrodos podem ser classificados em dois grupos: os eléctrodos metálicos e os eléctrodos ESI [72].

1.5.2.1 Eléctrodos metálicos

Os eléctrodos metálicos podem ser de Primeira Classe, Segunda Classe, Terceira Classe ou inertes. Os de Primeira Classe são utilizados na medição da actividade de um ião metálico em solução, os de Segunda Classe são usados para medir a actividade de uma segunda espécie que afecte a concentração dessa espécie metálica em solução e os de Terceira Classe são utilizados na mediação de uma terceira espécie, que afectaria a segunda espécie anterior, que por sua vez iria condicionar a concentração da espécie metálica. Nos eléctrodos inertes o sistema de oxidação - redução encontra-se em contacto com um metal inerte como a platina ou o ouro [72].

A resposta destes eléctrodos não apresenta grande selectividade, porque são acumuladas uma sequência de reacções químicas em solução, que ocorrem em contacto directo com todas as outras espécies que possam estar presentes na amostra, estando estreitamente dependentes destas.

1.5.2.2 Eléctrodos Selectivos de ião

No que diz respeito aos ESI, estes pertencem aos sensores químicos mais antigos, sendo principalmente baseados num elemento de reconhecimento, a membrana, que consiste em materiais condutores de iões de permeabilidade selectiva, que separa a amostra a partir do interior do eléctrodo. As membranas devem apresentar baixa solubilidade, condutividade eléctrica e reacções seletivas com o analíto. Estes eléctrodos têm sido utilizados em diversas áreas de análise, sendo de baixo custo, selectivos para um dado ião, sensíveis e aplicáveis numa ampla gama de condições experimentais. Neste sentido, ocorre uma redução do tempo e do custo envolvidos numa determinação analítica com eléctrodos selectivos de membrana. Além

disso os ESI possuem características que tornam a sua aplicação bastante abrangente [72-73], tais como:

- não são afectados pela turvação da amostra ou pela sua cor;
- não necessitam da adição de um reagente específico;
- maioria dos casos são suficientemente selectivos;
- fáceis de operar.

Os corpos de eléctrodos necessários para o suporte da membrana seletiva podem ser construídos de um modo fácil, simples e barato, como o ilustrado na Figura 1.7. Este suporte apresenta um sistema condutor sólido, baseado em grafite, e ausência de solução de referência interna, uma característica que simplifica o manuseamento do eléctrodo e aumenta a tempo de vida de operação dos mesmos por redução da pressão osmótica exercida por essa solução de referência na membrana.



Figura 1.7 -Eléctrodo Selectivo de ião.

De acordo com a natureza de membranas que integram, os ESI podem ser classificados em eléctrodos cristalinos, que podem ser homogéneos ou heterogéneos, e em não cristalinos, que podem ser eléctrodos de vidro ou com locais móveis. Os eléctrodos de membrana homogénea são constituídos por uma membrana de material cristalino preparada a partir de um único composto ou uma mistura homogénea de compostos como por exemplo Ag_2S , $\text{AgI} + \text{Ag}_2\text{S}$. Já os de membrana heterogénea são formados quando uma substância ou mistura de substâncias activas misturada(s) com uma matriz inerte, tal como borracha de silicone ou Poli(cloreto de vinilo) (PVC), formando assim uma membrana selectiva. No que diz respeito aos eléctrodos não cristalinos, estes são constituídos por uma membrana de matriz que pode ser rígida, no caso de ser de vidro, ou apresentar locais móveis, sendo normalmente colocada entre duas soluções aquosas. A matriz pode ainda ser porosa (éster de celulose) ou não porosa (vidro ou PVC). Os eléctrodos de vidro são constituídos por uma membrana de detecção que é um pedaço de vidro fino, no qual a composição química deste determina a selectividade da membrana. Por fim os eléctrodos não cristalinos e com locais móveis são compostos pelo permutador, solvente mediador e matriz de incorporação. O permutador é um material electroquímico, sendo

responsável pela resposta do eléctrodo podendo apresentar carga positiva, negativa ou ser neutro, a matriz de incorporação é baseada em polímeros em que as características da borracha à temperatura ambiente dependem da presença de um solvente mediador plastificante [72,74].

1.5.3 Sensores Potenciométricos

Os eléctrodos potenciométricos são dispositivos portáteis e de baixo custo que permitem a detecção das actividades iónicas em meios aquosos apresentando tipicamente uma resposta simples, directa, selectiva, exacta e precisa [70]. Existem hoje, e cada vez mais, várias versões miniaturizadas de corpos de eléctrodos para modificação com membranas selectivas.

A selectividade da resposta dos ESIs decorre da inclusão de um material específico na membrana selectiva que apresenta uma grande afinidade para um ião de interesse. A utilização de MIPs neste contexto é algo com menos de uma década e tem-se revelado uma estratégia muito promissora na melhoria do desempenho dos ESI. Comparativamente a outras técnicas de transdução, os tempos de resposta típicos são muito baixos, da ordem dos segundos, dado que as moléculas do molde não necessitam difundir-se através das membranas dos eléctrodos para produzir resposta analítica [44].

A técnica potenciométrica pode ser utilizada no desenvolvimento de sensores para proteínas, pois estas biomoléculas apresentam, em solução aquosa, múltiplos pontos de carga eléctrica. A magnitude dessa carga depende do ponto isoelectrico da proteína em causa e da composição iónica da solução, e o valor de sinal obtido na célula está condicionado pelas características teóricas de resposta dos ESI.

1.6 Considerações teóricas sobre sensores potenciométricos

O potencial de um eléctrodo indicador dependente da concentração do ião de interesse na solução em estudo, contudo este deve ser usado em combinação com um eléctrodo de referência, para formar uma célula electroquímica completa. Segundo as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry*(IUPAC), 1994, a diferença de potencial medida entre a actividade do ião na solução e o potencial desenvolvido no ESI é linearmente dependente do logaritmo da actividade de um dado ião em solução e definida pela equação de Nernst-Nicolski (equação 1.1) [75]. Nesta equação, ΔE é a força electromotriz (f.e.m.) de uma célula de ESI, que corresponde à diferença entre o potencial do mesmo e o potencial do eléctrodo de referência; R a constante dos gases perfeitos, 8,3144 J/(K×mol); T a temperatura termodinâmica, em K; F a constante de Faraday, 9,64846×10⁴ C/mol; Z_A a carga do ião

principal, a_A : actividade do ião principal, expressa em mol/L ou mol/kg; e “*constante*” o valor de f.e.m. que inclui o potencial normal do ESI, do eléctrodo de referência e da junção líquida, expresso em mV.

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

Sendo a equação de Nernst-Nicolski expressa em a , a sua aplicação pressupõe a uso de condições experimentais que garantam o conhecimento de alguns parâmetros de medida, como o “tamanho iónico” do ião alvo na solução ensaiada. Alguns destes parâmetros de medida podem ser encontrados para espécies inorgânicas convencionais, mas para a grande parte das espécies iónicas orgânicas torna-se quase impossível obter essa informação. Neste sentido, o procedimento habitual é substituir a por c , algo que é tecnicamente válido quando a força iónica, I , das soluções de medida se encontra ajustada. A I quantifica, segundo a equação 1.2, a intensidade do campo eléctrico decorrente da presença de iões em solução, considerando para isso a concentração de todos os iões presentes (c_i , mol/L) e a carga correspondente Z_i [75].

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

1.6.1 Curvas de calibração

A representação gráfica do logaritmo c de um dado ião em função da f.e.m. da célula electroquímica é designada por curva de calibração (Figura 1.8). Esta curva permite extrair informações importantes do ponto de vista analítico, nomeadamente o limite de detecção (LD), o limite inferior de resposta linear (LIRL) e o declive [74,75]. O LD corresponde à concentração de um dado ião no ponto de intersecção entre os segmentos de recta que prolongam os comportamentos lineares ou não lineares da curva. O LIRL corresponde à concentração de um dado ião a partir da qual a resposta da célula potenciométrica apresenta um comportamento linear. O declive da curva de calibração expressa a sensibilidade da resposta da célula potenciométrica, permitindo também aferir a sua qualidade. Em geral, o valor de declive experimental obtido deverá ser, em condições normais de pressão e temperatura, iguala $59,16/Z_A$ mV/década [74,75].

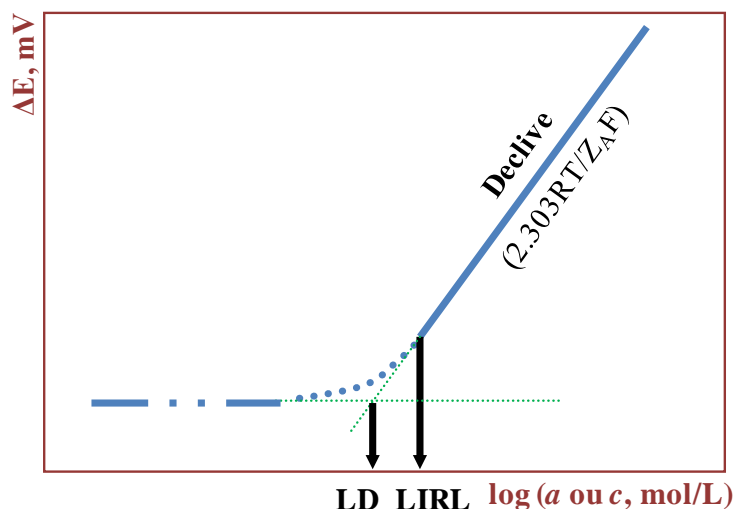


Figura 1.8 Curva de calibração característica de um electrodo selectivo de ião. (—•••—): sem variação nítida de potencial com a variação da *actividade* (a) ou *concentração* (c); (•••••): variação ligeira de potencial com a variação da a ou c , sem corresponder ao registo esperado na equação modificada de *Nernst-Nicolski*; (—): variação linear da variação da a ou c , previsto na equação modificada de *Nernst-Nicolski*; LD: limite de detecção, mol/L; LIRL: limite inferior de resposta linear, mol/L.

Para além das características já mencionadas, a curva de calibração permite extrair outras relevantes sobre as propriedades analíticas do ESI, como o tempo e a seletividade da resposta potenciométrica. Ambas as propriedades se encontram descritas nas recomendações da IUPAC, 1993 [76].

1.6.2 Tempo de resposta

O tempo de resposta dos ESIs é o tempo que decorre entre o momento em que os electrodos de referência e ESI são colocados em contacto com uma solução de ião principal, ou em que a a ou c do ião de interesse em solução é alterada, e o primeiro instante em que o declive $\Delta E/\Delta t$ iguala o tempo limite estabelecido (Δt) (Figura 1.9) [75]. Este valor limite é definido com base em questões de ordem experimental ou na exactidão pretendida para a leitura potenciométrica. De uma forma geral, o tempo de resposta dos ESIs depende da concentração absoluta presente na solução e da variação de c introduzida no sistema (diferença entre a concentração inicial e final de ião principal), sendo habitualmente registadas regiões de c incluídas na zona de resposta linear dos ESIs.

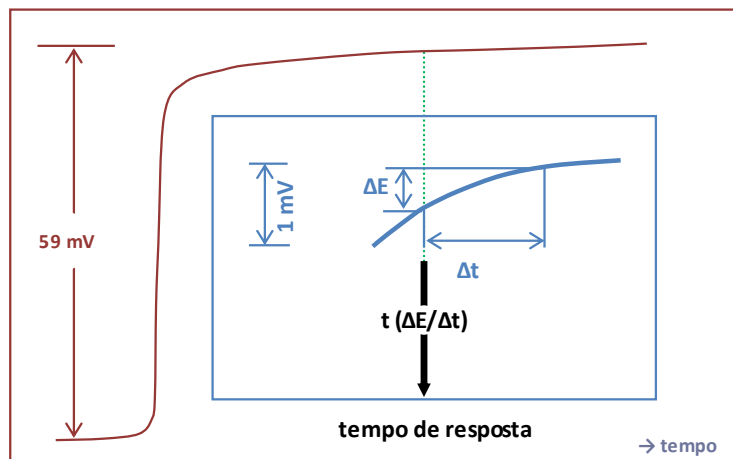


Figura 1.9-Representação gráfica do tempo de resposta, $t(\Delta E/\Delta t)$.

1.6.3 Efeito de pH

Considerando que qualquer ESI é capaz de detectar iões, as espécies que habitualmente interferem na resposta potenciométrica são outros iões presentes na solução de medida. Entre as várias espécies iónicas que se podem encontrar na solução, encontram-se sempre o protão e o anião hidroxilo em todas as soluções aquosas. Além da possibilidade de condicionarem directamente a resposta da membrana selectiva, a sua concentração condiciona também a carga da espécie medida, já que o grau de ionização da proteína varia grandemente com o pH.

Esta situação determina como requisito fundamental a utilização de soluções padrão e de amostra ajustadas a um mesmo valor de pH, valor esse escolhido de modo a que não represente uma interferência significativa nas leituras potenciométricas. Torna-se então necessário identificar um intervalo de valores de pH onde os sinais analíticos dos ESIs não sejam dependentes desse parâmetro. Esse estudo pode ser realizado de um modo simples através de curvas de calibração, traçadas a diferentes valores de pH.

A capacidade do ESI discriminar o ião a medir de outros que estejam presentes na solução, e que sejam diferentes do protão ou do hidroxilo, pressupõe a realização de estudos de selectividade adicionais.

1.6.4 Selectividade

A capacidade de um ESI distinguir o ião de interesse presente na solução em estudo de outros iões que possam coexistir numa amostra é calculado através do coeficiente de

seletividade potenciométrica, $K_{A,B}^{pot}$. O coeficiente de selectividade é avaliado pela resposta da célula do ESI numa solução mista que inclua o ião principal, A, e o ião interferente, B, ou numa solução separada de A e B. As actividades do ião principal e ião interferente é definido pela equação modificada de Nikolsky-Eisenman (Equação 1.3) [75].

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

Na equação de Nernst-Nicolski modificada encontram-se várias variáveis, como E : valor experimental de potencial de um ESI, R : constante dos gases perfeitos (8,3144 J/(K×mol)), T : temperatura termodinâmica (K), F : constante de Faraday (9,64846 ×10⁴ C/mol), a_A : actividade do ião principal (mol/L ou /kg), a_B : actividade do ião interferente (mol/L ou /kg), Z_A : carga do ião principal, Z_B : carga do ião interferente, “*constante*”: inclui o potencial normal do eléctrodo selectivo, o potencial do eléctrodo de referência e o potencial de junção líquida (mV) e K : coeficiente de seletividade potenciométrico relativamente ao ião interferente. Os coeficientes de seletividade potenciométrico podem ser determinados pelos seguintes métodos [75,77]:

- **Método de interferência fixada:** a diferença de potencial entre o eléctrodo de referência e o ESI é medida em soluções em que a actividade dos iões interferentes é constante e a actividade do ião principal é variável. Para o cálculo do respetivo coeficiente de seletividade potenciométrico, utiliza-se a expressão matemática representada pela Equação 1.4.

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

- **Método das soluções separadas:** a diferença de potencial entre o eléctrodo de referência e o ESI é medida em cada uma das soluções separadas, uma contendo o ião principal, com actividade a_A e outra contendo o ião interferente com a mesma actividade $a_B = a_A$. Se os valores medidos são E_A e E_B , respetivamente, o valor coeficiente de seletividade potenciométrico é calculado a partir da Equação 1.5.

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

- **Matched potential:** determina a actividade do ião interferente na qual a variação de potencial é a mesma para uma dada actividade do ião de interesse numa solução de referência. Para o cálculo do respetivo coeficiente de seletividade potenciométrico, utiliza-se a expressão matemática representada pela Equação 1.6.

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

Nos métodos da interferência fixada e das soluções separadas os coeficientes de seletividade potenciométrico são obtidos a partir da equação Nernst-Nicolski, no entanto esta apresenta algumas limitações. Uma delas diz respeito à falta de capacidade do ião interferente igualar o potencial do ião principal, em que se a carga do ião principal for menor, o coeficiente de seletividade potenciométrico determinado é muito baixo, sugerindo uma pequena interferência e vice-versa. A outra limitação prevê a existência de uma resposta *Nerstiana* quer para o ião principal quer para o interferente, por parte do eléctrodo, o que normalmente não acontece em relação a este último, principalmente se a sua carga difere da do ião principal. Assim, a IUPAC, 1995, recomenda como método para determinar o coeficiente de seletivamente potenciométrico o *matched-potential*, pois é simples de calcular e fácil de realizar. Porém, não se pode utilizar os coeficientes obtidos para se alcançar valores para a actividade do ião principal em soluções desconhecidas, servindo assim como orientação para indicar o grau de selectividade dos ESI [77].

Considerando todos os aspectos anteriores, o trabalho que se passa a descrever adiante tem por objetivo a construção de um sensor potenciométrico para Hb, que utiliza membranas selectivas cujos materiais sensores são do tipo MIP. Estes materiais são obtidos com técnicas de impressão em superfícies de sílica, um material de boa compatibilidade com sistemas proteicos.

2. Descrição Experimental

O trabalho desenvolvido consiste no desenvolvimento de uma metodologia rápida e barata para o doseamento da Hb, através da sintetização de material sensor para esta e utilização desse material na construção de um biossensor. Ao longo deste capítulo são referidas as metodologias envolvidas na síntese do material sensor e construção do biossensor, avaliação do desempenho analítico dos dispositivos obtidos e aplicação analítica em soro sintético.

2.1 Material e aparelhos utilizados

As soluções foram todas preparadas em balões volumétricos de classe A, com capacidades de 10,00 a 250,00 mL. Na medição de volumes foram utilizadas pipetas de vidro, classe A para volumes rigorosos, com capacidade de 10,00 – 25,00 mL e pipetas automáticas de volume regulável da VWR, para volumes inferiores, de 2-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L e de 1000-5000 μ L. As pesagens dos reagentes foram efectuadas numa balança RADWAG XA 110/X, com precisão de $\pm 0,0001$ g e em goblés com capacidades entre 10 a 50 mL. O banho de ultra-sons termostaticado, BANDELIN *Sonorex Digitec*, foi utilizado algumas vezes de forma a reduzir o tempo envolvido na dissolução de substâncias sólidas.

A diferença de potencial entre o eléctrodo de referência e o eléctrodo indicador foi obtida com um decimilivoltímetro *Crison* μ pH 2002 (sensibilidade $\pm 0,1$ mV), à temperatura ambiente, e sob agitação constante, por meio de um *Crison*, micro ST 2038. O sinal de saída foi ligado a um ponto de comutação com seis saídas, permitindo a leitura simultânea de seis eléctrodos selectivos, como se pode visualizar na Figura 2.1

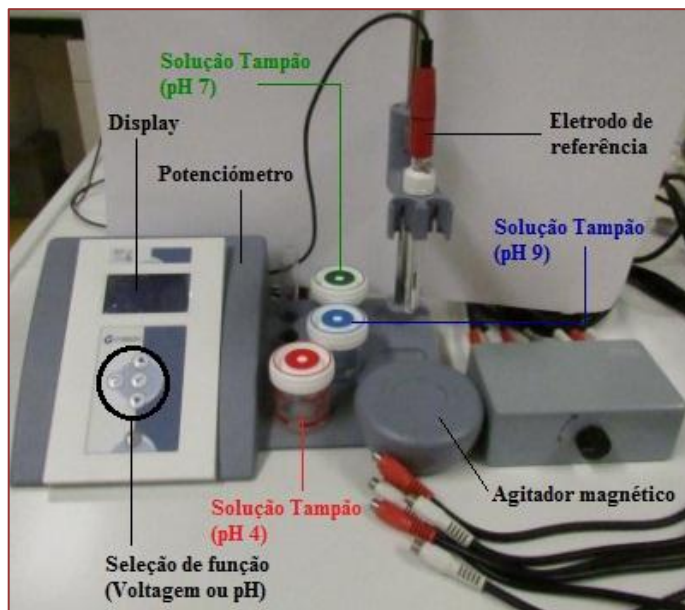


Figura 2.1 - Montagem utilizada na leitura potenciométrica, incluindo equipamento de medida e acessórios como agitador magnético e sistema de leitura múltipla e sequencial de vários ESIs.

A célula potenciométrica montada para obter informação sobre a variação da concentração do analito foi constituída por um eléctrodo indicador ESI que contém um condutor de epóxi/grafite (Figura 2.2 A)) e um eléctrodo de referência de dupla junção Ag/AgCl (Figura 2.2 B)).

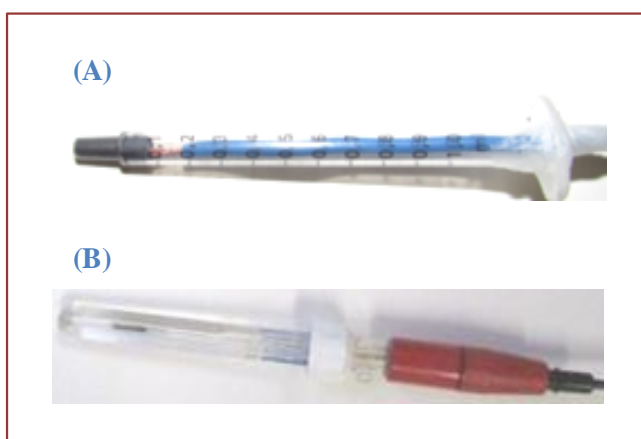


Figura 2.2- Fotografia do corpo do ESI construído no laboratório para este trabalho (A) e do eléctrodo de referência Ag/AgCl de proveniência comercial (B).

Para analisar as superfícies entre as partículas de sílica e as partículas modificadas desta, foi utilizado um microscópio eletrónico de varrimento (SEM) da JEOL, JSM 601 OLA *Advanced*

technology. Já a análise morfológica das membranas de PVC foram realizadas utilizando um microscópio da Nikon, modelo TMS. Para a análise de superfícies das membranas foram utilizados o espectrómetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da *Thermo Scientific Nicolet iS10* e o espectrómetro de Raman da *Thermo Scientific NicoletDXR*.

2.2 Reagentes

Todos os produtos químicos eram de grau analítico e a água utilizada para a preparação das soluções aquosas foi desionizada com condutividade inferior a 0,1 inferior $\mu\text{S}/\text{cm}$. As soluções aquosas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes, bem como por medições rigorosas de líquidos, e posterior diluição em solução.

A sílica (com partículas de tamanho de 120 a 200 μm e um diâmetro médio do poro de 697 Å), 4-(2-Hidroxiethyl)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES), Hb, Estireno, Proteinase Ke Mioglobina (Mio) foram comercializados pela *Sigma*. O 2-Nitrofeniloctil éter(oNFOE), N-hidroxissuccinimida (NHS), *Tetrakis*(4-clorofenil)borato (AdA) e o Brometo de tetracocilamônio (AdC) foram produzidos pela *Fluka*. O PVC, o Cloridrato de 2-aminoetilmetacrilato (AEMH), o Divinylbenzene (DVB), a Creatinina (Crea) e o *Tris*(2-metoxietoxi)vinilsilano (TMTVS), foram obtidos a partir da *Aldrich*. O Tetrahidrofurano (THF) e o ácido *L*-Ascórbico (AA) foram fornecidos pela *Riedel-Dehaen*. A *N*-Etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) e o 4-Estirenosulfonato de sódio (SSA) foram comercializados pela *AlfaAesar*. O peróxido de benzoílo (BPO) foi obtida pela *Himedia*. O 3-aminopropiltrióxissilano (APTES) foi produzido pela *Merck*, o tampão PBS pelo *Amresco*, a Glucose (Glu) pela *Fishere* a creatina-kinase foi obtido pelo *Acros*.

2.3 Preparação do sensor

Preparou-se quatro tipos de sensor, dois MIPs, um com monómeros carregados e outro sem esses monómeros e dois *non-imprinted polymer*(NIPs), um com monómeros carregados e outro sem estes também. Para a preparação de ambos os MIPs, a molécula molde utilizada foi a Hb com uma concentração de 5×10^{-5} mol/L. A preparação do MIP com monómeros carregados envolveu quatro etapas: i) a aaminação da sílica; ii) ligação da proteína; iii) adição dos monómeros carregados; iv) polimerização e v) remoção do modelo (Figura 2.3)

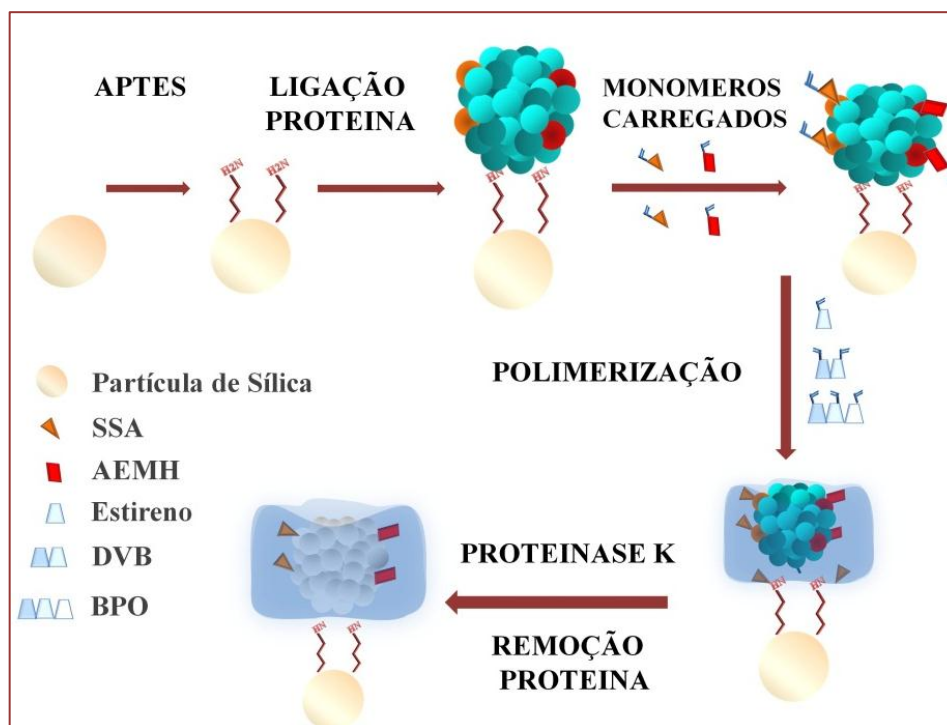


Figura 2.3 - Preparação do MIP com monómeros carregados.

A primeira etapa consistiu na ligação de camadas do grupo amina em cima das partículas esféricas de sílica. Para isso, incubaram-se cerca de 200 mg de sílica em APTES e TMTVS durante 4h. As partículas de sílica aminadas foram, em seguida, lavadas repetidamente com água destilada e etanol, e incubadas acerca de 45 ° C durante cerca de 20h. Em seguida, introduziu-se 1,5 mL da solução de 10 mmol/L de Hb com PBS a pH 7, ficando a incubar durante 3 horas a 4 ° C. Os grupos carboxílicos da proteína foram ativadas com 1,5 ml de uma solução aquosa contendo 25 mmol/L de NHS durante 5 minutos, após a adição de 50 mmol/L de EDAC. A suspensão resultante foi então centrifugada e o material sólido lavado completamente com água desionizada e PBS, para remover os reagentes que não reagiram. Em seguida, foram adicionados monómeros com grupos funcionais orgânicos carregados, 50 mmol/L de AEHM e 50 mmol/L de SSA, sendo esta mistura incubada durante a noite a 4°C. Posteriormente, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante removido. Depois, adicionou-se dois agentes reacionais, 50 mmol/L de Estireno e 50 mmolL⁻¹ de DVB, seguido pela adição de um iniciador radicalar, 50 mmol/L de BPO, mantidos sob agitação contínua durante 5 horas. Em seguida, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi removido. Por fim o sensor foi incubado durante a noite com 0,5 mg/mL de Proteínase K de forma a clivar ligações peptídicas e subsequente remoção da proteína impressos. O sensor foi lavado várias vezes com água desionizada e PBS de forma a remover os fragmentos de péptidos, centrifugado e seco a 40 ° C.

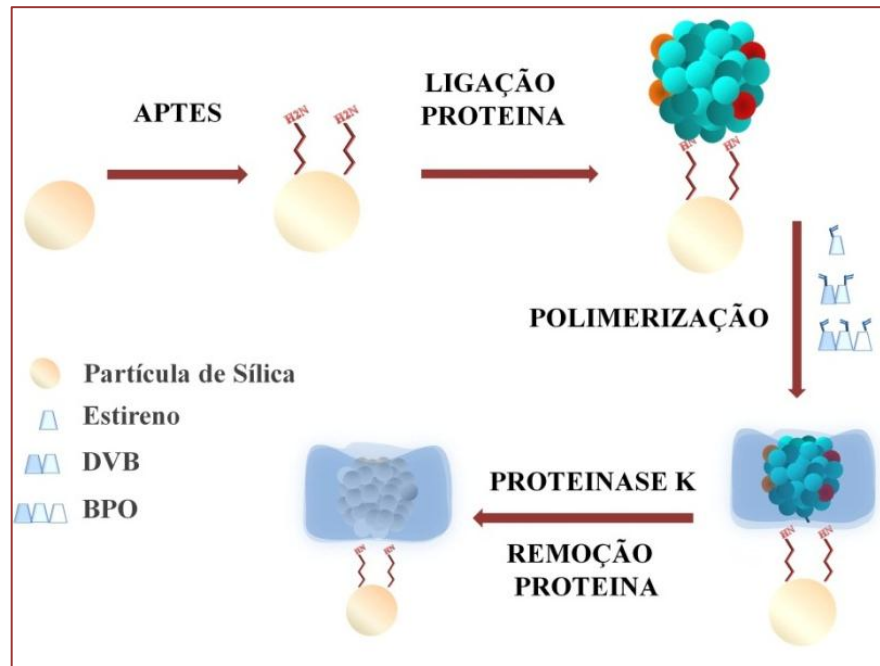


Figura 2.4- Preparação do MIP sem monómeros carregados.

Em paralelo, foram sintetizados o MIP sem monómeros carregados antes da fase de polimerização propriamente dita. Este processo é análogo na anterior, tendo-se omitido o passo de adição desses monómeros. O esquema geral encontra-se representado na Figura 2.4.

O material de controlo obtido sem a impressão da proteína (NIP) foi preparado de modo análogo ao indicado para o material MIP, mas removendo a proteína do processo geral de síntese. Este conceito foi aplicado na obtenção de materiais não impressos obtidos com (Figura 2.5) e sem (Figura 2.6) monómeros carregados.

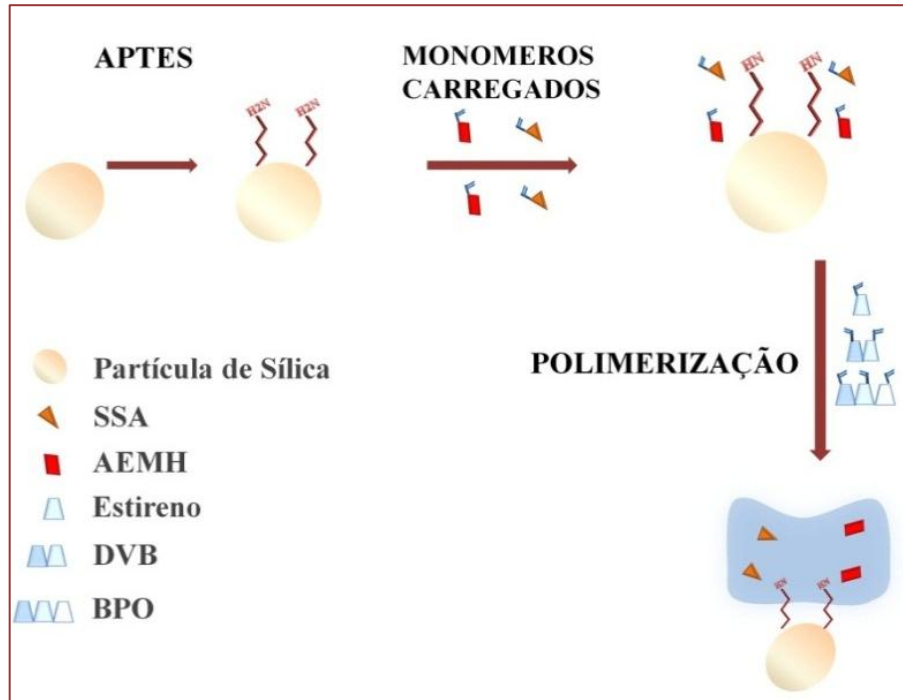


Figura 2.5- Preparação do NIP com monómeros carregados.

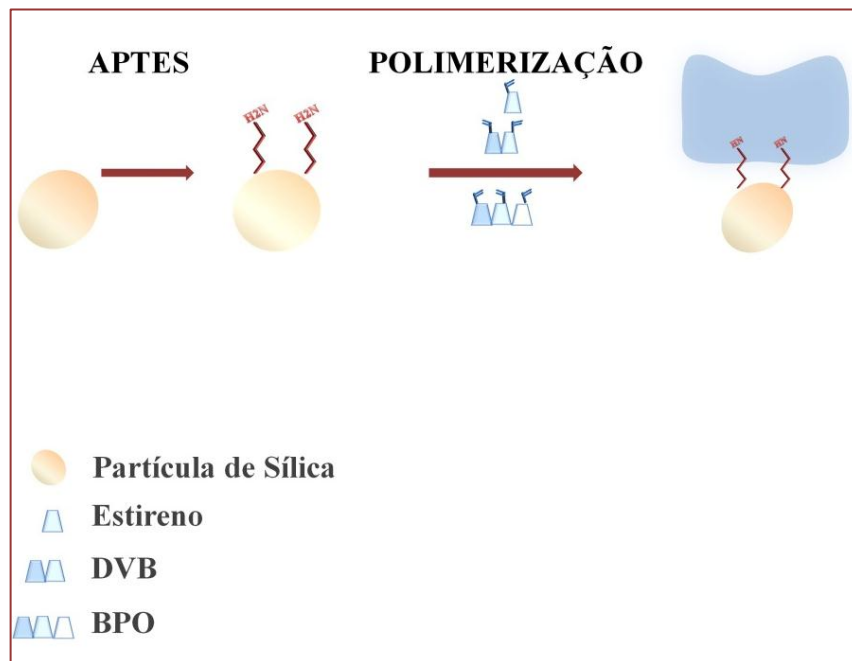


Figura 2.6- Preparação do NIP sem monómeros carregados.

2.4 Preparação de membranas

Neste trabalho prepararam-se 11 membranas (tabela 2.1) com o objectivo avaliar o efeito dos vários componentes na resposta potenciométrica. De uma forma geral, as membranas seletivas de Hb foram obtidas por mistura de 105 mg de PVC, 175 mg de oNFOE e 10 mg de material sensor (MIP e NIP com monómeros carregados e MIP e NIP sem monómeros carregados). Em algumas membranas foram adicionados 5 mg de *Tetrakis*(4-clorofenil)borato como aditivo aniónico (AdA) e noutras 5 mg de Brometo de tetracocetilamonio como aditivo catiónico (AdC). Foram ainda preparadas membranas sem material sensor, que funcionaram como controlo da presença do sensor na membrana, e sem material sensor mas com aditivo (catiónico ou aniónico, de modo a averiguar o efeito deste composto em isolado). A mistura foi agitada até que o PVC fosse bem humedecido e disperso em 2,5 mL de THF.

Tabela 2.1 – Membranas selectivas.

<i>Membranas</i>	<i>Material sensor</i>
Membrana 1	MIP com Monómeros Carregados (MM)
Membrana 2	NIP com Monómeros Carregados (NM)
Membrana 3	MIP com Monómeros Carregados e com AdC (MMC)
Membrana 4	MIP com Monómeros Carregados e com AdA (MMA)
Membrana 5	MIP sem Monómeros Carregados (M)
Membrana 6	NIP sem Monómeros Carregados (N)
Membrana 7	MIP sem Monómeros Carregados mas com AdC (MC)
Membrana 8	MIP sem Monómeros Carregados mas com AdA (MA)
Membrana 9	Controlo sem material sensor (contém apenas Solvente Mediador, CSM)
Membrana 10	Controlo com como material sensor AdA(CAA)
Membrana 11	Controlo com como material sensor AdC (CAC)

Estas membranas foram aplicadas nos suportes condutores de modo contínuo e deixadas a secar durante ~24 h (Figura 2.7). Depois disso, as membranas ligadas aos eléctrodos foram

condicionadas numa solução de 5×10^{-7} mol/L de Hb. Os eléctrodos foram mantidos nesta solução, durante aproximadamente 3h, antes de serem utilizados.



Figura 2.7-Vista de topo das membranas nos suportes condutores.

2.5 Preparação das soluções

As soluções padrão de $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L de Hb foram preparados em solução tampão. Os padrões de Hb menos concentrados foram preparados por diluição rigorosa da solução anterior em solução tampão. A solução tampão foi de HEPES, com uma concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. O pH desta solução foi alterado pela adição de quantidades adequadas de ácido clorídrico concentrado ou solução saturada de hidróxido de sódio, esta última preparada apenas no momento da sua utilização.

A interferência de outras espécies foi avaliada para uma solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L de Hb preparada em solução tampão de pH 5,0. As soluções de espécies interferentes foram de concentrações variáveis: Mio (90 $\mu\text{g/mL}$), Glu (900 $\mu\text{g/mL}$), CK-MB (100 $\mu\text{g/mL}$), AA (150 $\mu\text{g/mL}$) e Crea (1159 $\mu\text{g/mL}$). Estas soluções foram preparadas no mesmo tampão que a solução de Hb.

2.6 Avaliação comparativa dos eléctrodos

O funcionamento dos eléctrodos foi avaliado através da realização de várias curvas de calibração e efetuadas em diferentes pHs (3,5; 5,0; 6,0 e 9,0) e seguindo as recomendações da IUPAC [78]. A interferência de alguns compostos no sinal foi também avaliada, através da determinação dos respectivos coeficientes de selectividade.

Todas as medições potenciométricas foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação constante e os valores da f.e.m. de cada eléctrodo foram medidos a um valor constante de pH e de força iónica. As concentrações crescentes de Hb foram obtidas por transferência de 0,0200 - 2,5 mL de alíquotas de solução aquosa de Hb com concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L num copo de 50 mL, contendo 25,0 mL da solução tampão (HEPES) com uma concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. Os potenciais provenientes das soluções de Hb agitadas foram medidos à temperatura ambiente e depois registados com uma estabilização de $\pm 0,2$ mV. Entre os ensaios, os sensores foram acondicionados em água desionizada.

As curvas de calibração apresentadas na mesma condição de ensaio foram realizadas pelo menos três vezes e os seus parâmetros foram obtidos por tratamento das leituras efectuadas no programa de computador, *Microsoft Excel2010*. Os parâmetros considerados e posteriormente avaliados foram o LIRL, LD e declive. A partir destes parâmetros foi possível obter a reprodutibilidade através do cálculo do desvio padrão relativo (%) da média dos potenciais da solução padrão de 5×10^{-5} mol/L, obtidas a partir de várias calibrações realizadas nas mesmas condições experimentais e em momentos diferentes.

Para tempo de resposta definiu-se o tempo necessário para que o valor de potencial não variasse mais do que $\pm 0,2$ mV ao longo de um período de aproximadamente 10 a 15 s. Ao longo de uma mesma calibração encontraram-se valores diferentes de tempo de resposta, inerentes provavelmente ao volume adicionado de ião principal e à correspondente variação de concentração produzida. Assim, os tempos de resposta indicados referem-se sempre ao maior valor de tempo necessário a atingir o valor $\Delta E/\Delta t$ seleccionado.

2.7 Avaliação da seletividade dos eléctrodos

Os coeficientes de seletividade potenciométricos, $K_{A,B}^{pot}$, foram obtidos pelo *matched potential*. A concentração inicial do ião principal foi definido como 20 $\mu\text{g/mL}$ e a actividade da solução de ião principal adicionado a esta foi de 112 $\mu\text{g/mL}$. A mudança de potencial correspondente foi de cerca de 8 mV. A interferência de Mio, Glu, CK-MB, AA e Crea foi avaliada pela adição de pequenas alíquotas das soluções correspondentes para a solução de ião principal até à mesma variação do potencial foi observada, isto é, até que o incremento de 8mV fosse alcançado, assegurando que a concentração final do ião principal não fosse alterada em mais a 5%.

2.8 Análise da superfície

Os materiais sensores tipos MIP (MMA e MA), NIP (N) e controlo (CAA) preparados foram sujeitos a análise de microscopia eletrónica SEM, realizada à temperatura ambiente e no modo de baixo vácuo. As esferas de sílica modificadas, secas, foram recobertas de ouro por deposição, utilizando um sistema de pulverização que acompanhava o equipamento SEM.

Para confirmar que a cor avermelhada das membranas era proveniente da Hb, traçou-se o espectro de FTIR e de Raman de vários materiais: uma membrana baseada em MMA que acumulava 6 calibrações e que foi retirada ao corpo de eléctrodo onde encontrava; uma membrana de controlo, baseada em MAA, mas sem qualquer calibração e por isso sem qualquer contacto prévio com Hb, tendo sido também removida do corpo do eléctrodo; e o pó seco de hemoglobina (reagente utilizado na preparação das soluções padrão). Os espectros foram traçados diretamente sobre as amostras, tendo-se recorrido ao acessório de Refletância Difusa Atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Diffuse Reflectance*) em FTIR e ao sistema de microscopia confocal em Espectroscopia de Raman,

As diferenças observadas por microscopia ótica entre várias membranas, antes e depois do traçado da curva de calibração, foram obtidas por observação direta em microscópio ótico, à temperatura ambiente, tendo-se registado a imagem obtida em formato digital. As membranas incluídas neste estudo foram as MAA, MA, N e CAA. Estas membranas foram subtidas todas às mesmas condições experimentais (solução padrão, solução tampão e pH 5), antes da sua observação.

2.9 Análise de amostras

A análise de amostras foi efectuada em soro sintético e avaliadas em curvas de calibração. Através da substituição do potencial na equação de regressão linear da calibração prévia, calcularam-se as concentrações de Hb. Os resultados obtidos corresponderam sempre à média de, pelo menos, duas calibrações e a sua precisão foi calculada por intermédio do desvio padrão correspondente.

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão abordados a ligação da Hb durante a preparação do sensor e a avaliação comparativa dos eléctrodos contendo as diferentes membranas preparadas, bem como a influência do pH no desempenho destes. A interferência de alguns compostos na concentração final do ião principal, a análise da superfície das partículas modificadas, e morfologia das membranas de PVC também serão avaliadas.

3.1 Características Gerais de Funcionamento dos Sensores

A preparação de diferentes membranas permitiu identificar qual a composição que permite obter o melhor desempenho potenciométrico. Todos os materiais usados como sensores nas membranas selectivas foram obtidos por impressão na superfície de partículas de sílica, a fim de aumentar o número de locais de ligação eficazes. A escolha das partículas de sílica decorreu da sua grande área superficial, da sua capacidade de adsorver e de reconhecer moldes proteicos, e da sua compatibilidade com uma vasta gama de transdutores. Assim, as partículas de sílica foram utilizadas como material de base para a montagem da Hb/MIP na sua superfície [52,79].

Numa tentativa de aumentar afinidade da Hb para o seu local de ligação na matriz polimérica, foram adicionados monómeros de cargas positivas e negativas em torno da proteína, permitindo-se a sua pré-organização estrutural antes da polimerização propriamente dita. Para o controlo deste processo, foram preparados materiais análogos sem estes monómeros.

Considerando que os materiais sensores neutros podem desempenhar um papel de ionóforo não carregado na membrana, e que nesse caso é necessária a adição de um aditivo iónico para se obter alguma resposta potenciométrica, optou-se pela preparação paralela de membranas que apresentavam uma quantidade muito reduzida desses aditivos. Foram usados aditivos de carga positiva, tetraoctilamónio, e negativa, *Tetrakis*(4-clorofenil)borato, em membranas separadas, considerando que o tipo de carga da proteína depende do pH da solução. Tipicamente, a adição de um composto iónico de natureza lipofílica de um sensor potenciométrico diminui a interferência de espécies de carga contrária e diminui a resistência eléctrica das membranas.

O parâmetro que mais condiciona a resposta de um eléctrodo selectivo a uma proteína é o pH, dada a sua enorme influência na resposta da membrana, por um lado, e na ionização do analito, por outro. Neste sentido, o primeiro teste realizado neste estudo consistiu na tentativa de identificação da condição de pH mais adequada à resposta dos eléctrodos.

3.1.1 Efeito do pH

Os sensores de Hb foram preparados com compostos ativos na detecção potenciométrica (MIP com monómeros, MIP, NIP com monómeros, NIP e partículas em branco) dispersos num material plastificante de elevada constante dielétrica e PVC. A avaliação das suas principais características analíticas seguiu as recomendações da IUPAC [78] e foi realizada em diferentes pHs (3,5, 5, 6 e 9).

3.1.1.1 Tampão de pH 3,5

A calibração com $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de tampão HEPES demonstrou que apenas os ESI compostos por MMA, MA e CAA funcionaram nestas condições (tabela 3.1). Porém, nem todos os eléctrodos apresentaram valores de declive elevados. Apenas o ESI 8 apresentou um declive igual ou superior ao valor teórico, tendo-se obtido um médio igual a 76,5 mV/década. Este eléctrodo evidenciou um regime de resposta linear face ao logaritmo de concentração para valores de [Hb] inferiores a 23,2 $\mu\text{g/mL}$, apresentando limites de detecção médios de 28,5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 3.1 -Composição das membranas seletivas de Hb em 105 mg de PVC e suas características potenciométricas em $1,0 \times 10^{-2}$ mol/ tampão HEPES, pH 3,5.

Característica	ESI 1	ESI 2	ESI 3	ESI 4	ESI 5	ESI 6	ESI 7	ESI 8	ESI 9	ESI 10	ESI 11
Sensor	MM	NM	MMC	MMA	M	N	MC	MA	CSM	CAA	CAC
Aditivo	—	—	AdC	AdA	—	—	AdC	AdA	—	AdA	AdC
Declive (mV/década)	—	—	—	48,5 ($\pm 8,8$)	—	—	—	76,5 ($\pm 1,0$)	—	37,7 ($\pm 5,6$)	—
$R^2(n=5)$	—	—	—	0,983	—	—	—	0,983	—	0,979	—
LD($\mu\text{g/mL}$)	—	—	—	11,9	—	—	—	28,5	—	10,6	—
LIRL($\mu\text{g/mL}$)	—	—	—	48,7	—	—	—	23,2	—	60,7	—

O comportamento linear do sensor MAA foi verificado para concentrações inferiores a $48,7\mu\text{g/mL}$, apresentando limites de detecção de $11,9\mu\text{g/mL}$ e um declive médio de $48,5\text{ mV/década}$. Já o ESI 10 mostra um comportamento linear com $\log[\text{Hb}]$ abaixo de $60,7\ \mu\text{g/mL}$, apresentando limites de detecção de $10,6\ \mu\text{g/mL}$ e um declive de $37,7\text{ mV/década}$. Os coeficientes de correlação apresentados foram sempre superiores a $0,978$.

No global, apesar dos sensores CCA apresentarem melhor LD, Os sensores obtidos a partir do MA revelaram um desempenho operacional melhor em termos de LIRL. Para além disso, apresentam melhor sensibilidade do que os restantes sensores(Figura 3.1).

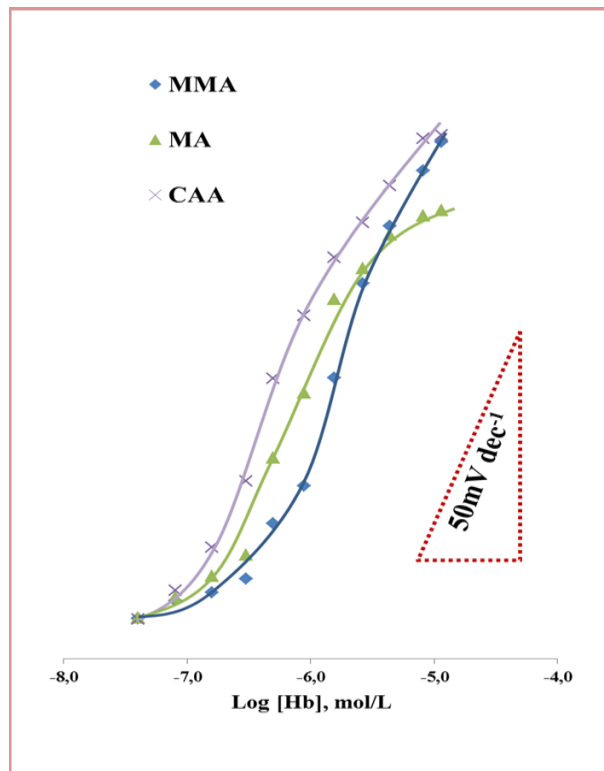


Figura 3.1 -Calibração com concentração de 5×10^{-5} de Hb em tampão HEPES pH 3,5.

Para este pH também foram testadas diferentes concentrações de Hb, com o objetivo de se descobrir qual a gama em que este analito permitia obter melhor resposta. Assim numa primeira calibração foi utilizada uma concentração de $1,0\times 10^{-5}\text{ mol/L}$ de Hb e nas mesmas condições experimentais. O resultado obtido é ilustrado na Figura.3.2.

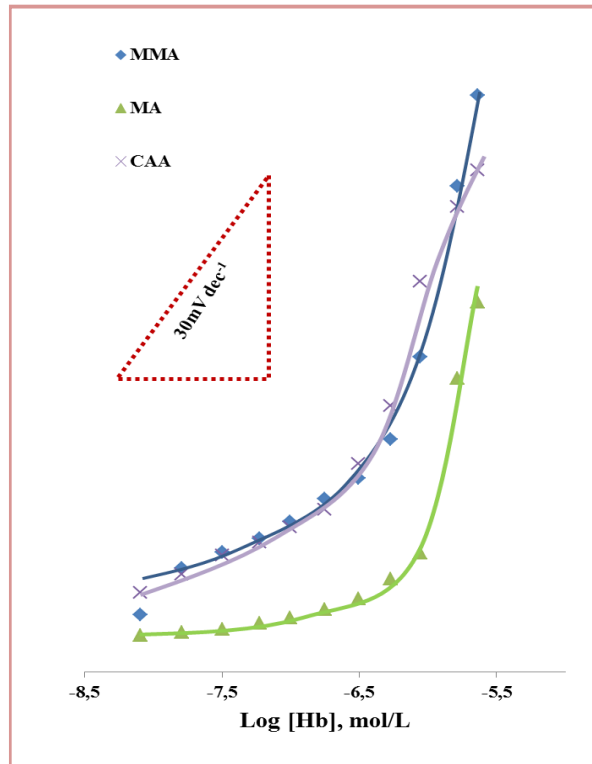


Figura 3.2 -Calibração com concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ de Hb em tampão HEPES pH 3,5.

Como se pode verificar, todos os sensores apresentados começaram a exibir um comportamento linear quando a concentração de Hb era mais elevada. Assim aumentou-se a concentração de Hb na solução padrão para $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L, mantendo sempre as mesmas condições experimentais, de forma verificar se era esta a gama ideal para o ESI operar.

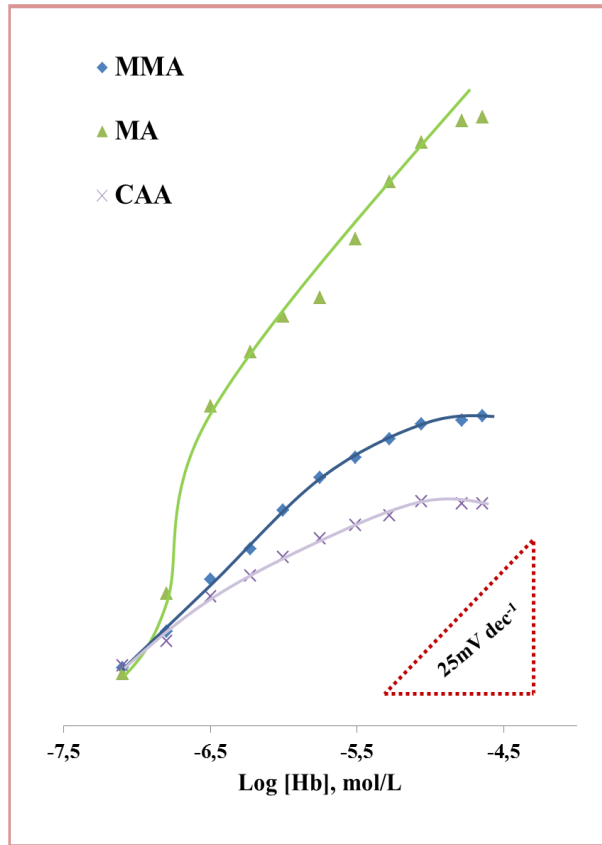


Figura 3.3 -Calibração com concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ de Hb em tampão HEPES pH 3,5.

A Figura 3.3 demonstra que todos os sensores apresentados começaram a exibir um comportamento linear quando a Hb se apresentava em concentrações mais baixas, começando a “saturar”o sinal obtido relativamente para concentrações intermédias. Assim, optou-se pela utilização de soluções padrão de Hb de concentração igual a $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L, estando esta entre as duas gamas de concentração anteriormente estudadas.

3.1.1.2 Tampão de pH 5,0

A calibração dos eléctrodos em soluções de pH 5,0 foi efectuada nas mesmas condições que a anterior. Mais uma vez, apenas os ESI compostos por MMA, MA e CAA variaram o potencial registado com a concentração (tabela 3.2). No entanto, estes eléctrodos apresentaram um declive abaixo do valor teórico e mais reduzido do que o anterior. O sensor MMA apresentou um comportamento linear com $\log[\text{Hb}]$ para concentrações inferiores a $83,8 \mu\text{g/mL}$, apresentando limites de deteção de $43,8 \mu\text{g/mL}$ e um declive médio de $40,4 \text{ mV/década}$. Os sensores MA e CAA exibiram um comportamento linear com $\log[\text{Hb}]$ abaixo de $42,5$ e $29,3 \mu\text{g/mL}$, respetivamente, com LD de $32,5$ e $30,7 \mu\text{g/mL}$ e declives de $33,5$ e $29,3 \text{ mV/década}$, respetivamente. Os coeficientes de correlação obtidos foram sempre superiores a $0,976$.

Tabela 3.2 -Composição das membranas seletivas de Hb em 105 mg de PVC e suas características potenciométricas em $1,0 \times 10^{-2}$ mol/ tampão HEPES, pH 5,0.

Característica	ESI 1	ESI 2	ESI 3	ESI 4	ESI 5	ESI 6	ESI 7	ESI 8	ESI 9	ESI 10	ESI 11
Sensor	MM	NM	MMC	MMA	M	N	MC	MA	CSM	CAA	CAC
Aditivo	—	—	AdC	AdA	—	—	AdC	AdA	—	AdA	AdC
Declive (mV/década)	—	—	—	40,4 ($\pm 5,6$)	—	—	—	33,5 ($\pm 5,5$)	—	29,3 ($\pm 8,7$)	—
$R^2(n=5)$	—	—	—	0,984	—	—	—	0,987	—	0,976	—
LD($\mu\text{g/mL}$)	—	—	—	43,8	—	—	—	32,5	—	30,7	—
LIRL($\mu\text{g/mL}$)	—	—	—	83,8	—	—	—	42,5	—	29,3	—

Os sensores obtidos a partir do MMA revelaram assim uma melhor sensibilidade na detecção do analito, demonstrando, contudo, um comportamento linear a partir de concentrações elevadas quando comparado com os demais eléctrodos com resposta. No que diz respeito ao LIRL e LD o sensor CAA apresenta melhores resultados (Figura 3.4).

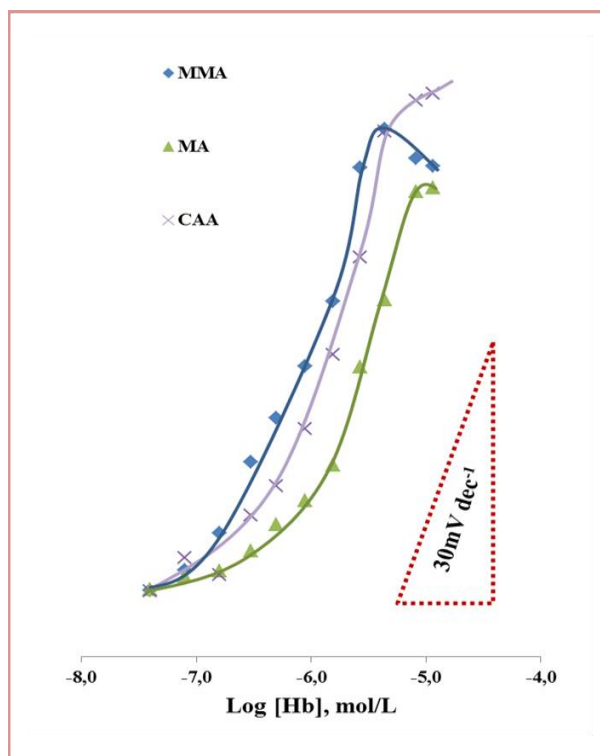


Figura 3.4 -Calibração com concentração de 5×10^{-5} de Hb em tampão HEPES pH 5,0.

3.1.1.3 Tampão pH 6,0

A calibração neste pH efectuou-se nas mesmas condições que as anteriores. Ao analisar os dados obtidos, e apresentados na tabela 3.3, observou-se a ausência de comportamento linear a pH 6,0, de sensibilidade muito inferior àquela obtida para espécies de tripla carga. O comportamento próximo do linear foi até 6,3 e 4,5 $\mu\text{g/mL}$ para a Hb, com declives catiónicos de 11,7 e 14,5 mV/década e limites de detecção de 3,5 e 4,1 $\mu\text{g/mL}$ para os sensores baseados em MMA e MA. Os coeficientes de correlação apresentados foram sempre superiores a 0,976. Nenhum comportamento linear foi obtido para o ESI 10. Muito provavelmente, este registo esteve associado à aproximação do pH do ponto isoelétrico da proteína, condição em que esta se apresenta sem qualquer carga iónica efectiva global.

Tabela 3. 3 -Composição das membranas seletivas de Hb em 105 mg de PVC e suas características potenciométricas em $1,0 \times 10^{-2}$ mol/ tampão HEPES, pH 6,0.

Característica	ESI 1	ESI 2	ESI 3	ESI 4	ESI 5	ESI 6	ESI 7	ESI 8	ESI 9	ESI 10	ESI 11
Sensor	MM	NM	MMC	MMA	M	N	MC	MA	CSM	CAA	CAC
Aditivo	—	—	AdC	AdA	—	—	AdC	AdA	—	AdA	AdC
Declive (mV/década)	—	—	—	11,7 ($\pm 1,1$)	—	—	—	14,5 ($\pm 4,5$)	—	—	—
$R^2(n=5)$	—	—	—	0,990	—	—	—	0,999	—	—	—
LD($\mu\text{g/mL}$)	—	—	—	3,5	—	—	—	4,1	—	—	—
LIRL($\mu\text{g/mL}$)	—	—	—	6,3	—	—	—	4,5	—	—	—

3.1.2 Resumo do efeito pH

Relativamente ao funcionamento dos eléctrodos em pH 9 (tabela 3.4), verificou-se que nenhum eléctrodo obteve um comportamento linear, significando que o sensor é sensível apenas em meio ácido. Este aspecto é consistente com uma impressão efectiva da proteína nas partículas de sílica, uma vez que uma mudança de pH desta natureza altera o grau de ionização exterior da proteína e muito provavelmente a sua conformação. Em suma, nenhum dos materiais poderia reconhecer a proteína porque a pH 9 ela encontra-se com características exteriores diferentes daquelas utilizadas para constituir o molde.

Todos os sensores tipo NIP, independentemente de ter ou não monómeros carregados ou de ter ou não aditivo iónico, não foram capazes de produzir qualquer resposta potenciométrica que se relacionasse com a concentração. Este registo indica claramente a inexistência de lugares não específicos de interacção entre o modelo e o polímero.

Tabela 3. 4 -Composição da membrana dos sensores de Hb com 105 mg de PVC e as suas características potenciométricas em 1.0×10^{-2} mol/L de HEPES, pH 3.5, 5.0, 6.0 e 9.0.

pH	Composição da membrana				Declive (mV/decade)	R ² (n = 5)	LD (µg/mL)	LIRL (µg/mL)
	Sensor	Plastificante	Aditivo	Massa (g)				
3.5	MMA	oNFOE	TpCIPB	10:175	48,5 ± 8,8	0,988	11,9	48,7
	MA	oNFOE	TpCIPB	10:175	76,5 ± 1,0	0,983	28,5	23,2
	CAA	oNFOE	TpCIPB	10:175	37,7 ± 5,6	0,979	10,6	60,7
	NIP	oNFOE	TpCIPB	10:175	ND	ND	ND	ND
5.0	MMA	oNFOE	TpCIPB	10:175	40,4 ± 5,6	0,984	43,8	83,8
	MA	oNFOE	TpCIPB	10:175	33,5 ± 5,5	0,987	32,5	42,5
	CAA	oNFOE	TpCIPB	10:175	29,3 ± 8,7	0,976	30,7	29,3
	NIP	oNFOE	TpCIPB	10:175	ND	ND	ND	ND
6.0	MMA	oNFOE	TpCIPB	10:175	11,7 ± 1,1	0,990	3,5	6,3
	MA	oNFOE	TpCIPB	10:175	14,5 ± 4,5	0,999	4,1	4,5
	CAA	oNFOE	TpCIPB	10:175	ND	ND	ND	ND
	NIP	oNFOE	TpCIPB	10:175	ND	ND	ND	ND
9.0	MMA	oNFOE	TpCIPB	10:175	ND	ND	ND	ND
	MA	oNFOE	TpCIPB	10:175	ND	ND	ND	ND
	CAA	oNFOE	TpCIPB	10:175	ND	ND	ND	ND
	NIP	oNFOE	TpCIPB	10:175	ND	ND	ND	ND

De um modo geral, as melhores características operacionais em termos de sensibilidade e detecção foram obtidas em pH 3,5 (Figura 3.5) com o material MMA. No entanto, um valor de pH tão baixo poderia induzir uma possível interferência da resposta potenciométrica, em virtude

da concentração de H^+ nessa gama ser demasiado elevada. Por outro lado, o valor de pH 5 encontra-se mais próximo das condições fisiológicas, assegurando uma maior estabilidade da proteína comparativamente à sua forma nativa.

Neste sentido, os ensaios posteriores foram realizados a pH 5. Nesta condição era expectável que o ESI apresentasse um declive teórico, embora o valor exacto fosse desconhecido em virtude de não se conhecer a carga iónica da proteína nesse tampão. A natureza da carga é seguramente positiva, já que os potenciais dos eléctrodos aumentam com o aumento da concentração de Hb.

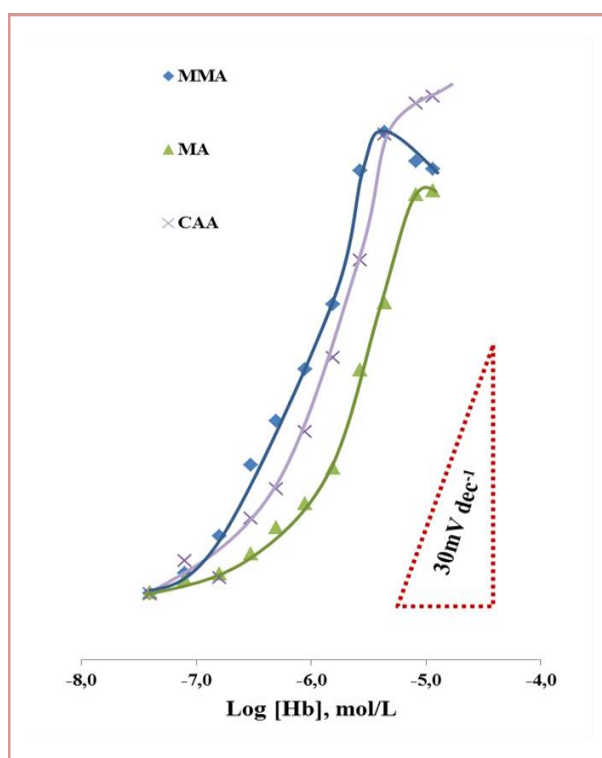


Figura 3.5 -Comparação das calibrações em pH 3,5 e pH 5.

3.1.3 Tempo de resposta, tempo de vida e estabilidade

O tempo de resposta foi aqui definido como o tempo necessário para atingir um valor de potencial constante de ± 3 mV. Este estudo foi considerado para soluções de Hb com uma concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L. O rápido aumento de concentração, para 10 \times , conduzir a variações de potencial que estabilizaram em menos de 300 s.

Foram ainda observadas ainda uma elevada repetibilidade e reprodutibilidade da f.e.m. para calibrações realizadas em dias consecutivos. Em geral, os limites de detecção, tempos de

resposta, e declives foram reprodutíveis dentro de $\pm 5\%$ de seus valores originais ao longo de um período de pelo menos 2 semanas.

3.2 Análise da morfologia das membranas de PVC

As membranas de PVC apresentavam, após seis calibrações, uma cor visivelmente vermelhada, tal como se pode verificar nas fotografias representadas na Figura 3.6. A intensidade dessa cor foi maior nos ESI que funcionavam melhor (MMA, MA e CAA), indicando por isso que estas membranas apresentavam uma maior afinidade para a Hb.

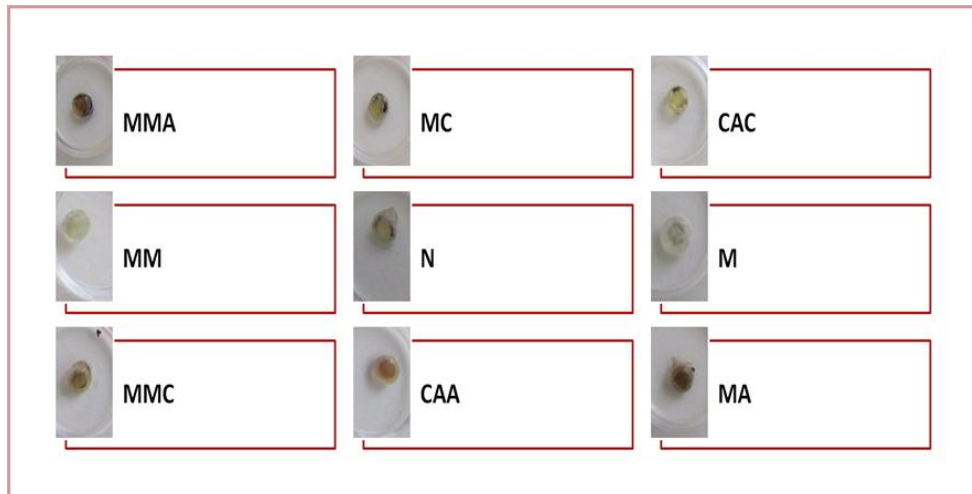


Figura 3.6 - Membranas de PVC após seis calibrações.

Como único elemento comum entre as membranas MMA, MA e CAA seria o aditivo aniônico, esta observação parece sugerir que a proteína carregada positivamente seria atraída para a membrana por atracção iónica decorrente da presença deste aditivo de carga contrária. No entanto, como a membrana MMA apresenta uma coloração muito mais intensa do que os controlos CAC e CAA, o material sensor MIP contribuiu também para este efeito, possivelmente retendo a Hb na membrana pela sua elevada afinidade para a mesma.

Todas as membranas diferentes das MMA, MA ou CAA não apresentaram qualquer coloração, tudo indicando que não continham Hb no seu interior. Isto parece sugerir que estas não apresentariam qualquer afinidade para com a proteína, algo que corroborou com a ausência de resposta potenciométrica das unidades correspondentes.

A primeira abordagem para averiguar a veracidade destas considerações, foi avaliar o aspecto das membranas MMA, MA e CAA por microscopia ótica. As imagens recolhidas encontram-se representadas na Figura 3.7 e revelaram, através da perspectiva superior, que todas as membranas apresentavam uma cor avermelhada bastante intensa, possivelmente devido à Hb. Foi feito entretanto um corte transversal na membrana, para se perceber a profundidade da penetração da Hb. Os resultados indicaram que a Hb se apresentava distribuída de modo regular em toda a membrana, sendo a intensidade observada de topo análoga àquela observada no interior da mesma.

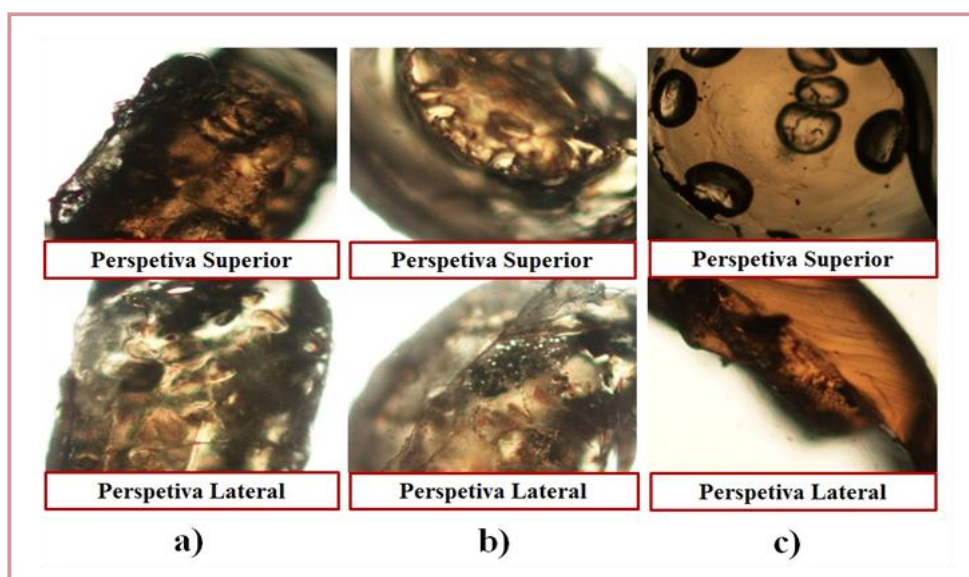


Figura 3.7 -a) Morfologia da membrana MMA; b) Morfologia da membrana MA; c) Morfologia da membrana CAA.

A cor mais intensa da membrana MMA sugeriu efectivamente a contribuição do material MIP para uma retenção diferenciada da Hb na membrana (comparativamente às MA e CAA). Para se perceber se este fenómeno estaria associado à impressão molecular no material MIP, foi avaliada a membrana N, testada com o mesmo número de calibrações que as anteriores. Os resultados obtidos encontra-se na Figura 3.8 e demonstram que a membrana não apresenta vestígios de Hb, visto que não adquiriu a sua cor característica, como as anteriores. Este resultado corrobora com o facto dos eléctrodos NIP não apresentar qualquer afinidade para a Hb, um comportamento coerente com aquele observado nas curvas de calibração a diferentes valores de pH.

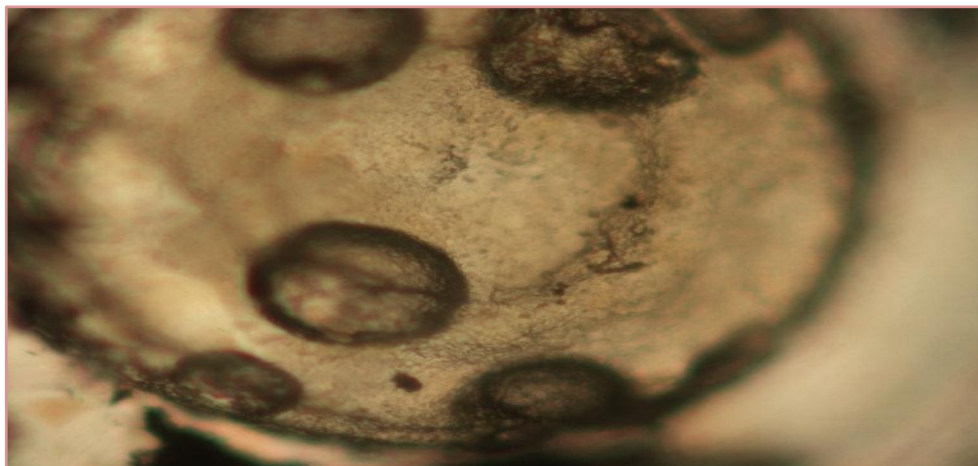


Figura 3.8 -Morfologia da membrana baseada em NIP.

A atribuição da cor vermelha à Hb foi confirmada mais adiante, com base em análises qualitativas e comparativas entre as membranas que apresentavam MMA, MA e CAA.

3.3 Análise da superfície das partículas modificadas

A SEM foi utilizada para capturar a morfologia pormenorizada das esferas de sílica e das partículas do MIP com monómeros e NIP com monómeros. As esferas de sílica, com uma matriz muito rígida e superfície hidrofílica, foram depositadas num suporte adequado para a visualização de moléculas orgânicas ou biológicas (Figura 3.9).



Figura 3.9 -Suporte utilizado para analisar as diferentes morfologias das partículas de sílica.

As partículas de sílica tinham um diâmetro médio de $\sim 161 \mu\text{m}$, e continham principalmente por Si e S, antes de modificação de superfície (Figura 3.10). O diâmetro de variou da matriz sílica variou entre 30 e $40 \mu\text{m}$.

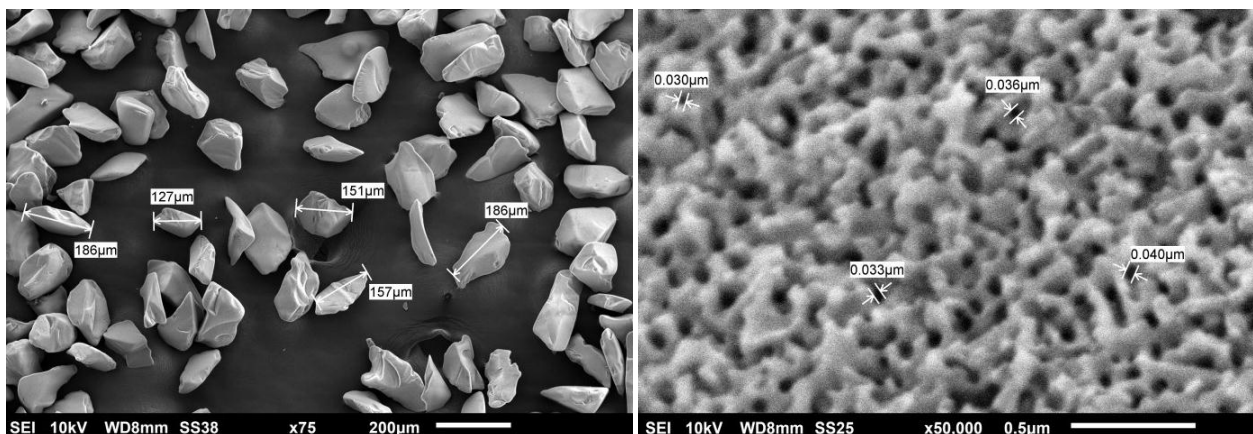


Figura 3.10 -Partículas de sílica não modificadas, seu tamanho (esquerda) e diâmetro de poro (direita).

O processo de polimerização promoveu um aumento evidente no diâmetro médio das partículas de sílica, apresentando nesta fase um valor médio de $170 \mu\text{m}$ nos materiais de MIP, como se pode observar na Figura 3.11. Formou-se aqui uma camada secundária sobre a sílica, revelando assim a presença do polímero em torno destas. O aspecto poroso observado no material foi completamente alterado relativamente ao da sílica original, apresentando também diâmetros de poro numa gama mais alargada.

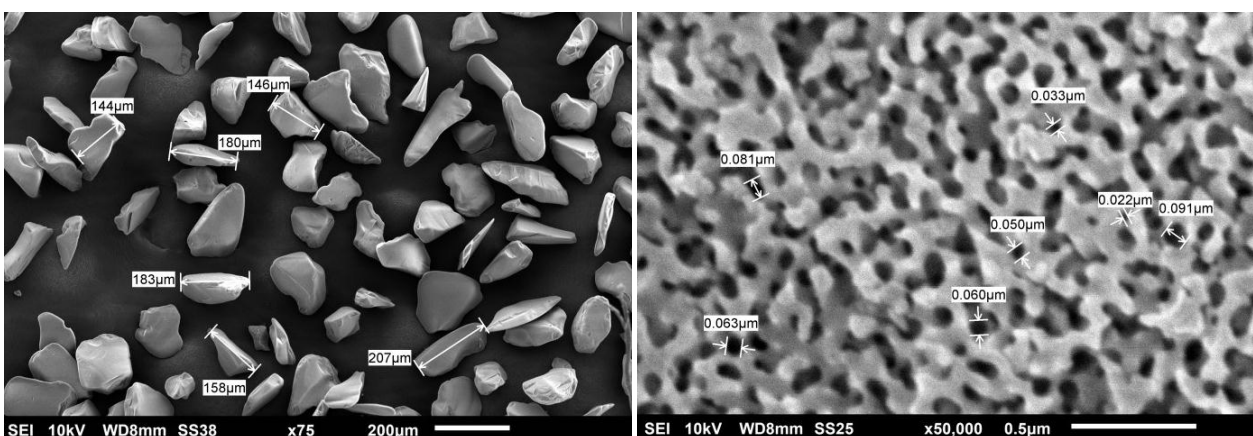


Figura 3.11 - Partículas de sílica modificadas com formato MIP, seu tamanho (esquerda) e diâmetro de poro (direita).

Relativamente ao material NIP foi observado um comportamento análogo ao encontrado com o material MIP (Figura 3.12). Efectivamente, a técnica SEM não permite identificar as diferenças espaciais decorrentes da presença ou ausência da proteína na impressão. No entanto, uma análise mais detalhada permite verificar que há diferenças do ponto de vista da porosidade. A média do diâmetro dos poros dos materiais sílica, MIP e NIP foi de 34,8; 58,3 e 51,4 nm, respetivamente. É possível que a maior porosidade observada nos materiais MIP se relacione com a presença da proteína aquando do processo de impressão. A elevada porosidade do material do MIP poderá também ter beneficiado a adsorção da proteína molde para este tipo de material, corroborando assim com a falta de resposta dos materiais MIP.

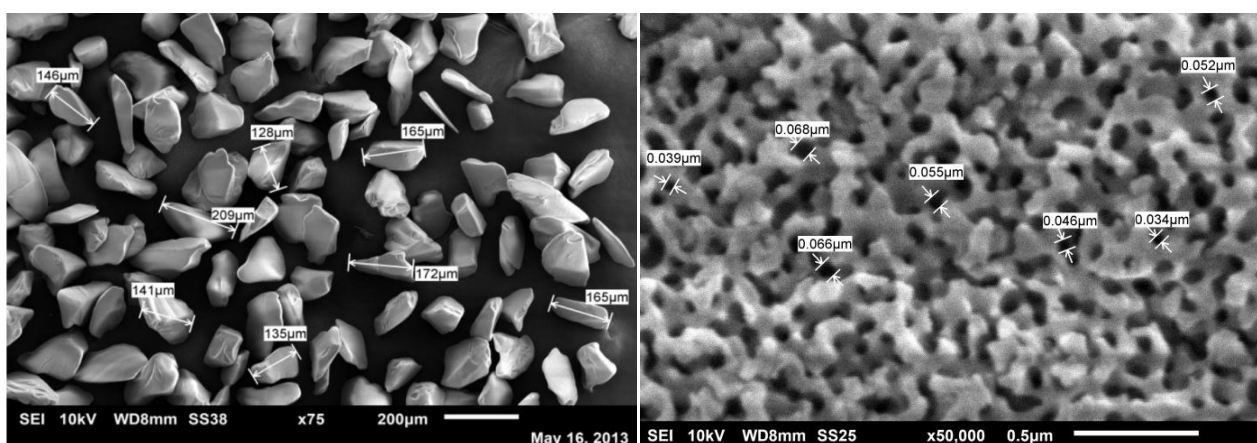


Figura 3.12 - Partículas de sílica modificadas com formato NIP, seu tamanho (esquerda) e diâmetro de poro (direita).

A análise de superfície sobre as membranas foi realizada posteriormente no sentido de confirmar a presença de Hb nas membranas com resposta potenciométrica.

3.4 Análise de superfície das membranas seletivas

A partir da visualização da Figura 3.13 é possível observar que existem algumas diferenças notórias entre o espectro traçado na membrana de PVC (Branco) e o da membrana baseada de MMA. A primeira diferença verifica-se entre os 2730 a 3100 cm^{-1} , no qual existe um aumento de intensidade de Raman da membrana MMA, a atingir o seu máximo nos 2914.08 cm^{-1} , quando comparada com a membrana de PVC (Branco). Verificam-se ainda mais duas diferenças entre os 1550 e 1690 cm^{-1} e entre os 1010 e 1400 cm^{-1} , os quais apresentam um valor máximo de 1580.50 e 1348.53 cm^{-1} , respetivamente. Estas duas alterações apresentam um valor de

intensidade menor do que as apresentadas pela membrana branco, as quais apresentam o valor máximo de 1584.66 e 1357.60 cm^{-1} para o mesmo intervalo. Estes resultados sugerem que a membrana de MMA incorporou Hb na sua matriz polimérica, visto que os valores de Raman *Shift* apresentam diferenças significativas nas regiões indicadas.

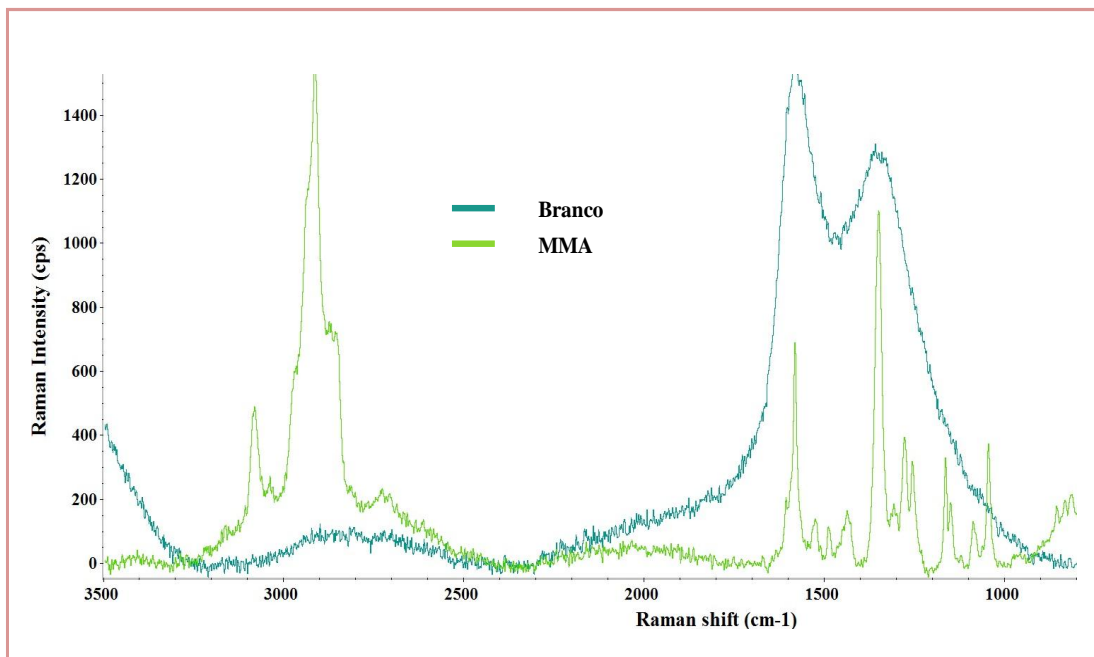


Figura 3.13 - Espectro de Raman de amostras de membranas selectivas MAA, que tinham estado em contacto com a Hb ou sem contacto (branco).

Os resultados obtidos por FTIR para membranas sem e com Hb (MAA) são apresentados na Figura 3.14. Os registos obtidos evidenciam pontos de diferença significativa entre as membranas, antes e depois do contacto com Hb. Esses pontos situam-se nas regiões de número de onda entre 3200 e 3300 cm^{-1} e entre 1600 e 1700 cm^{-1} .

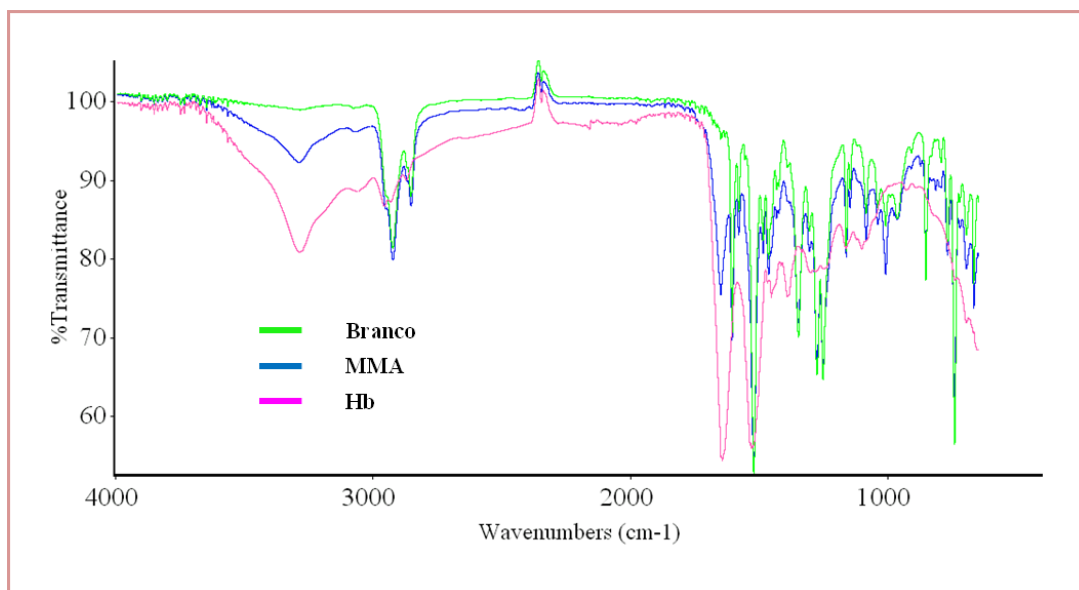


Figura 3.14 - Espectros de FTIR/ATR para amostras de membrana de MAA, antes (branco) ou depois de contactar com a Hb, e a Hb propriamente dita.

No intervalo entre 3200 e 3300 cm^{-1} observa-se um decréscimo de transmitância que deverá estar associado à presença de grupos característicos funcionais típicos dos vários grupos - R presentes nos aminoácidos que a Hb contém. Além destes grupos, as proteínas contêm ainda ligações amídicas (ou peptídicas) e ligações terminais N e C, com grupos amina e carboxílico, respetivamente. A redução de transmitância observada resulta, por isso, provavelmente de vibrações de estiramento de ligações OH e NH, atingindo o seu valor máximo aos 3291.10 cm^{-1} . Tendo em conta as bandas típicas dos vários grupos funcionais, e após consulta das tabelas de correlação de *Colthup*, os grupos característicos da Hb associados a esta região podem ser amidas e aminas, cuja vibração de estiramento se localizam entre 3200 e 3500 cm^{-1} e entre 3100 e 3400 cm^{-1} , respetivamente. Para além disso, podem ainda estar presentes ácidos carboxílicos, na sequência do arredondamento entre os 3350 e os 3500 cm^{-1} .

A diferença entre os espectros localizada entre os 1600 e os 1700 cm^{-1} é característica do estiramento C=O, estiramento C=N e estiramento C=C, atingindo o seu valor máximo aos 1652.15 cm^{-1} . Estas vibrações sugerem a presença de grupos ionizados de álcoois, com vibração característica entre 1500 e 1700 cm^{-1} .

No sentido de verificar se as diferenças observadas entre os espectros anteriores surgiram da presença da Hb, optou-se pelo traçado do espectro deste composto. O espectro obtido permitiu identificar bandas semelhantes às registadas com a membrana MMA em contacto com Hb. Estas semelhanças estavam centradas precisamente nas regiões que foram anteriormente assinaladas como pontos de diferenciação entre as duas membranas e que poderiam induzir a presença de

Hb na membrana testada: intervalo entre 3100 e 3450 cm^{-1} e entre 1590 e 1700 cm^{-1} , tendo atingido um pico máximo aos 3286.19 e 1645.91 cm^{-1} respetivamente. Estes resultados confirmam que as alterações existentes na membrana MMA calibrada foram obtidas devido à presença de Hb dentro da membrana.

3.5 Seletividade do sensor

A análise da selectividade é das características mais desafiadora dos ESI, pois estes eléctrodos são selectivos para um ião, mas não específicos para essa espécie, podendo detectar outros iões na solução. O comportamento de selectividade dos ESI utilizados na deteção de Hb foi observado pelo cálculo de coeficientes de seletividade potenciométrico e o método correspondente utilizado para este estudo foi o *matched potential*.

A seletividade do sensor foi testada contra a Mio, Glu, CKMB, AA e Crea nos seus níveis máximos admitidos, sendo a sua presença no soro acima desses limites ser altamente improvável. O sensor baseado em MMA mostra boas características em termos de sensibilidade e selectividade quando o nível destes compostos foi menor do que o seu nível de fluidos biológicos tais como o soro. Estes valores foram: Mio (570 ng/mL), Glu (0,68 ng/mL), CK-MB (2,4 ng/mL), AA (150 ng/mL), e Crea (240 ng/ml), respetivamente. De uma forma geral, os resultados obtidos sugerem que os eléctrodos podem ser aplicados às amostras, sem que seja esperadas interferências da sua matriz.

3.6 Análise de amostras

Este método foi aplicado para determinar a Hb em amostras enriquecidas de Hb com concentrações que vão de 33,3 a 160,4 mg/mL. Foi encontrada uma boa concordância entre os valores adicionados e encontrados de Hb. Os resultados da análise potenciométrica conduzida apresentaram uma recuperação, variando entre os 93,8 e 105,3% com um desvio padrão da média relativa de 5,0%. O erro relativo variou entre 1,0 - 6,6 com um desvio padrão da média relativa de 5,1%.

4. Conclusões

A técnica de impressão molecular em superfície de sílica utilizando monómeros carregados com aditivo aniônico foi aplicada com sucesso na produção de sensores de Hb biomiméticos de transdução potenciométrica.

A interação entre a Hb e os materiais biomiméticos restringiu-se aos locais de ligação dimensionados na impressão, dado que apenas os materiais impressos foram capazes de produzir sinal. De uma forma geral, o processo que envolveu monómeros carregados originou dispositivos com características de resposta ligeiramente superiores aos materiais análogos sem estes monómeros, sugerindo que a presença destes compostos iônicos pode aumentar a afinidade entre o material biomimético e a Hb.

A obtenção de resposta potenciométrica dependeu grandemente das características de pH do meio e requereu membranas seletivas com um aditivo iônico. Esta última característica induz que o material impresso apresentou um comportamento de carregador neutro na membrana, já que esta condição impõe a necessidade incluir uma espécie iônica de carga contrária na membrana para que a Hb (molécula alvo) possa ser reconhecida.

De uma forma geral, os sensores preparados apresentaram simplicidade na concepção, baixo tempo de resposta, boa precisão, alta precisão, baixo limite de deteção e boa seletividade. Escolhendo uma membrana adequada, o método proposto é simples, de baixo custo, preciso, exato e barato, podendo constituir, num futuro próximo, um método alternativo para a deteção de Hb em POC.

Naturalmente, todos os trabalhos podem ser sempre melhorados e este não é exceção. Considerando os resultados obtidos, seria interessante tentar reproduzir a metodologia de impressão selecionada num suporte diferente do da sílica, tal como nanopartículas de ouro ou nanoestruturas de carbono. Estes nanomateriais apresentam características elétricas excepcionais, que podem favorecer as características de resposta dos ESI.

5. Referências Bibliográficas

- [1] S. Pakapongpan, R. Palangsuntikul, W. Surareungchai. Electrochemical sensors for hemoglobin and myoglobin detection based on methylene blue-multiwalled carbon nanotubes nano-hybrid-modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*. 2011, Vol. 56, 6831 - 6836.
- [2] S. K. Hartwell, B. Srisawang, P. Kongtawelert, et al. Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta*. 2005, Vol. 65, 1149 - 1161.
- [3] M. Chonchol, C. Nielson. Hemoglobin levels and coronary artery disease. *American Heart Journal*. 2008, Vol. 155, 494 - 498.
- [4] I. S. Anand. Anemia and Chronic Heart Failure : Implications and Treatment Options. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008, Vol. 52, 501 - 511.
- [5] J. E. Groopman, L. M. Itri. Chemotherapy-Induced Anemia in Adults: Incidence and Treatment. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999, Vol. 91, 1616 - 1634.
- [6] K. Knight, S. Wade, L. Balducci. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *The American Journal of Medicine*. 2004, Vol. 116, 11 - 26.
- [7] C. Bokemeyer, K. Oechsle, J. T. Hartmann. Anaemia in cancer patients: pathophysiology, incidence and treatment. *European Journal of Clinical Investigation*. 2005, Vol. 35, 26 - 31.
- [8] L. Chen, C. Huang, W. Chen, et al. Using photoluminescent gold nanodots to detect hemoglobin in diluted blood samples. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, Vol. 43, 38 - 44.
- [9] N. Brandan, M. V. Aguirre, C. E. Giménez. Hemoglobina. Facultad de Medicina - UNNE, República da Argentina : s.n., 2008. Cátedra de Bioquímica.
- [10] X. Yang, X. Guo, H. Li. Fluorimetric determination of hemoglobin using spiro form rhodamine B hydrazide in a micellar medium. *Talanta*. 2003, Vol. 61, 439 - 445.
- [11] S. Qin. New fluorimetric determination of hemoglobin used as a Substitute of mimetic peroxidase. *Annali di Chimica*. 2007, Vol. 97, 59 - 67.

[12] S. De, A. Girigoswami. A fluorimetric and circular dichroism study of hemoglobin - Effect of pH and anionic amphiphiles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, Vol. 296, 324 - 331.

[13] R. E. Pecoraro, R. J. Graf, J. B. Halter, et al. Comparison of a colorimetric assay for glycosylated Hemoglobin with ion-exchange chromatography. *Diabetes*. 1979, Vol. 28, 1120 - 1125.

[14] J. E. Bender, A. B. Shang, E. W. Moretti, et al. Noninvasive monitoring of tissue hemoglobin using UV-VIS diffuse reflectance spectroscopy: a pilot study. *Optical Society of America*. 2009, Vol. 17, 23396 - 23409.

[15] Electrochemical Methods. [autor do livro] D. Harvey. *Modern analytical chemistry*. s.l. : McGraw-Hill Higher, 2000.

[16] T. Y. Guo, Y. Q. Xia, G. J. Hao, et al. Chemically modified chitosan beads as molecularly imprinted polymer matrix for adsorptive separation of proteins. *Chinese Chemical Letters*. 2004, Vol. 15, 1339-1341.

[17] C. J. A. Doelman, C. W. M. Siebelder, W. A. Nijhof, et al. Capillary electrophoresis system for hemoglobin A1c determinations evaluated. *Clinical Chemistry*. 1997, Vol. 43, 644 - 648.

[18] A. Joutovsky, J. Hadzi-Nesic, M. A. Nardi. HPLC Retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: A study of 60 000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clinical Chemistry*. 2004, Vol. 50, 1736 - 1747.

[19] R. V. Kirk, L. M. Sandhaus, J. D. Hoyer. The detection and diagnosis of hemoglobin A2' by High-Performance Liquid Chromatography. *American Society for Clinical Pathology*. 2005, Vol. 123, 657 - 661.

[20] K. Lubert, K. Kalcher. History of electroanalytical methods. *Electroanalysis*. 2010, Vol. 22, 1937 - 1946.

[21] B. Uslu, S. A. Ozkan. Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments. *Electrochemistry*. 2011, Vol. 44, 2644 - 2702.

[22] S. A. Ozkan. Principles and techniques of electroanalytical stripping methods for pharmaceutically active compounds in dosage forms and biological samples. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2009, Vol. 5, 127 - 143.

[23] B. Dogan-Topal, B. Bozal, B. T. Demircigil, et al. Electroanalytical studies and simultaneous determination of amlodipine besylate and atorvastatin calcium in binary mixtures

using first derivative of the ratio-voltammetric methods. *Electroanalysis*. 2009, Vol. 21, 2427 - 2439.

[24] M. R. Majidi, A. Saadatirad, E.I Alipour. Voltammetric Determination of Hemoglobin Using a Pencil Lead Electrode. *Electroanalysis* . 2011, Vol. 23, 1984 - 1990.

[25] Z. Tong, R. Yuan, Y. Chai, et al. Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on Hemoglobin/DNA/Poly-2,6-pyridinediamine modified gold electrode. *Thin Solid Films*. 2007, Vol. 515, 8054 - 8058.

[26] J. Song, X. Kang, W. Guo. Determination of hemoglobin in plasma and serum by linear - sweep polarography. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* . 1997, Vol. 357 , 127-129.

[27] M. Shyamala, C. R. Kiefer, H. Moscoso, et al. Simple and rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of hemoglobin C[$\alpha 2\beta 26(A3)Glu \rightarrow Lys$] in cord blood using a monoclonal antibody. *American Journal of Hematology*. 1990 , Vol. 33, 198 - 204.

[28] H. Qiaojia, T. Yuchai, L. Weiping , et al. Qualitative bedside assay of increased human serum myoglobin by sandwich dot-immunogold filtration for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta*. 1998, Vol. 273, 119 - 130.

[29] S. Kuntaruk, T. Tatu, T. Keowkarnkah, et al. Sandwich ELISA for hemoglobin A2 quantification and identification of b-thalassemia carriers. *International Journal of Hematology*. 2010, Vol. 91, 219 - 228.

[30] P. R. Smith, M. T. Wilson. Detection of haemoglobin in human skeletal remains by ELISA. *Journal of Archaeological Science*. 1990, Vol. 17, 255 - 268.

[31] Z. Makita. Radioimmunoassay for the determination of glycated hemoglobin and its clinical significance. *The Hokkaido Journal of Medical Science*. 1989, Vol. 64 , 65 - 74.

[32] L. Quarino, L. Kobilinsky. Development of a radioimmunoassay for the detection of human-hemoglobin. *Federation Proceedings*. 1987, Vol. 46 , 726 - 726.

[33] K. Rosenlof, F. Fyhrquist, I. Hortling, et al. Radioimmunoassay of hemoglobin-f in k-562 cells following induction with renin substrate and erythropoietin. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* . 1985, Vol. 45, 373 - 378 .

[34] S. J. Twyman, d. J. Rowe. A sensitive radioimmunoassay for the determination of haemoglobin in urine. *Annals of Clinical Biochemistry* . 1995, Vol. 32 , 506 - 508.

[35] L. Quarino, L. Kobilinsky. Development of a radioimmunoassay technique for the detection of human hemoglobin in dried bloodstains. *Journal of Forensic Sciences*. 1988 , Vol. 33, 1369-1378.

[36] B. W. Bae, S. D. Lee, H. S. Suk, et al. *Hemoglobin a1c detection sensor which uses an immunochromatographic assay comprising substrate, nitrocellulose membrane, assembly pad, absorption pad, hemoglobin a1c detecting portion and sample pad*. KR2006009665-A; KR602952-B1 26 de Julho de 2004.

[37] V. A. Briand, V. Thilakarathne, R. M. Kasi, et al. Novel surface plasmon resonance sensor for the detection of heme at biological levels via highly selective recognition by apo-hemoglobin. *Talanta*. 2012, Vol. 99, 113 - 118.

[38] J. Liu, L. Chen, M. Shih, et al. The investigation of recognition interaction between phenylboronate monolayer and glycosylated hemoglobin using surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*. 2008, Vol. 375, 90 - 96.

[39] S. Sonezaki, S. Yagi, E. Ogawa, et al. Analysis of the interaction between monoclonal antibodies and human hemoglobin (native and cross-linked) using a surface plasmon resonance (SPR) biosensor. *Journal of Immunological Methods*. 2000, Vol. 238, 99-106.

[40] N. Masqué, R. M. Marcé, F. Borrull. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. *Trends in Analytical Chemistry*. 1998, Vol. 17, 384 - 394.

[41] A. G. Mayes, K. Mosbach. Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry? *Trends in Analytical Chemistry*. 1997, Vol. 16, 321 - 332.

[42] C. R. T. Tarley, M.D.P.T. Sotomayor, L.T. Kubota. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. *Química Nova*. 2005, Vol. 28, 1076 - 1086.

[43] L. J. Pauling. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies. *Journal of the American Chemical Society*. 1940, Vol. 62, 2643 - 2657.

[44] R. Lianga, R. Zhanga, W. Qin. Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymer for determination of melamine in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2009, Vol. 141, 544 - 550.

[45] L. Ye, K. Mosbach. The Technique of Molecular Imprinting – Principle, State of the Art, and Future Aspects. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2001, Vol. 41, 107 - 113.

[46] F. T.C. Moreira, S. Sharma, R. A.F. Dutra, et al. Smart plastic antibody material (SPAM) tailored on disposable screen printed electrodes for protein recognition: Application to myoglobin detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, Vol. 45, 237 - 244.

- [47] F. T. C. Moreira, R. B. Queirós, L. A. A. Truta, et al. Host-Tailored sensors for Leucomalachite green potentiometric measurements. *Journal of Chemistry*. 2013, Vol. 2013, 1 - 13.
- [48] S. M. Reddy, G. Sette, Q. Phan. Electrochemical probing of selective haemoglobin binding in hydrogel-based molecularly imprinted polymers. *Electrochimica Acta*. 2011.
- [49] D. R. Kryscio, N. A. Peppas. Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta Biomaterialia*. 2012, Vol. 8, 461 - 473.
- [50] S. Piletsky, A. Turner. *Molecular Imprinting of Polymers*. Georgetown, Texas : Eurekah.com/Landes Bioscience, 2006.
- [51] Y. Wang, Y. Zhou, J. Sokolov, et al. A potentiometric protein sensor built with surface molecular imprinting method. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008, Vol. 24, 162–166.
- [52] T. Shiomi, M. Matsui, F. Mizukami, et al. A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, 5564 - 5571.
- [53] Q. Gai, Q. Liu, W. Li, et al. Preparation of bovine hemoglobin-imprinted polymer beads via the photografting surface-modified method. 2008, Vol. 3, 370 - 377.
- [54] C. J. Tan, H. G. Chua, K. H. Ker, et al. Preparation of Bovine Serum Albumin Surface-Imprinted Submicrometer Particles with Magnetic Susceptibility through Core-Shell Miniemulsion Polymerization. *Analytical Chemistry*. 2008, Vol. 80, 683 - 692.
- [55] A. Merkoçi, S. Alegret. New materials for electrochemical sensing IV. Molecular imprinted polymers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2002, Vol. 21, 717 - 725.
- [56] F. Qiao, H. Sun, H. Yan, et al. Molecularly Imprinted Polymers for Solid Phase Extraction. *Chromatographia*. 2006, Vol. 64, 625 - 634.
- [57] F. T. C. Moreira, R. A. F. Dutra, J. P. C. Noronhad, et al. Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, Vol. 28, 243– 250.
- [58] L. Lin, H. Xiwen, C. Langxing, et al. Preparation of novel bovine hemoglobin surface imprinted polystyrene nanoparticles with magnetic susceptibility. *Science in China Series B: Chemistry*. 2009, Vol. 52, 1402 - 1411.
- [59] Y. Wang, Z. Zhang, V. Jain, et al. Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2010, Vol. 146, 381 - 387.
- [60] V. Mirsky, A. Yatsimirsky. *Artificial receptors for chemical sensors*. Germany : WILEY-VCH, 2011.

[61]M. Sheikholeslam, M. D. Pritzker, P. Chen. Electrochemical Biosensor for Glycated Hemoglobin (HbA1c). *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*. University of Waterloo, Canada : InTech, 2011. 293-320.

[62] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*. 2001, Vol. 16 , 121 - 131.

[63]M. Pohanka, P. Skládal. Electrochemical biosensors – principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine*. 2008, Vol. 6, 57 - 64 .

[64]C. Huang, H. Bai, C. Li, et al. A graphene oxide/hemoglobin composite hydrogel for enzymatic catalysis in organic solvents. *Chem. Commun*. 2011, Vol. 47, 4962 - 4964.

[65]P. B. Lippa, L. J. Sokoll, D. W. Chan. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 2001, Vol. 314 , 1 - 26.

[66] L. Qu, S. Xia, C. Bian, et al. A micro-potentiometric hemoglobin immunosensor based on electropolymerized polypyrrole–gold nanoparticles composite. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009, Vol. 24, 3419 - 3424.

[67]Q. Xue, C. Bian, H. Zhang, et al. An integrated micro immunosensor for hemoglobin-Ale level detection. *IEEE*. 2010, 208 - 212.

[68]G. Liu, S. M. Khor, S. G. Iyengar, et al. Development of an electrochemical immunosensor for the detection of HbA1c in serum. *Analyst*. 2012, Vol. 137, 829 - 832 .

[69] C. Bian, J. Tong, J. Sun, et al. A field effect transistor (FET)-based immunosensor for detection of HbA1c and Hb. *Biomed Microdevices* . 2011, Vol. 13, 345 - 352.

[70]M. R. Ganjali, F. Faridbod, A. A. Saboury, et al. A New Approach for Protein Binding Isotherm Analysis by Means of an Electrochemical Microsensor. *International Journal of Electrochemical Science*. 2010, Vol. 5, 630 - 638.

[71] S. Martin, W. James, Jr. Ross. Electrode for Sensing Fluoride Ion Activity in Solution. *Science*. 1966, Vol. 154, 1553-1555.

[72] F. Moreira. Determinação de Norfloxacin em aquacultura. *Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Universidade do Porto*. Porto : s.n., 2009.

[73] M. N. Abbas, G. A. E. Mostafa, A. M. A. Homoda. PVC membrane ion selective electrode for the determination of pentachlorophenol in water, wood and soil using tetrazolium pentachlorophenolate. *Talanta*. 2001, 647 – 656.

[74]R. W. Burnett, A. K. Covington, N. Fogh-Andersen, et al. Use of Ion-Selective Electrodes for Blood-Electrolyte Analysis. Recommendations for Nomenclature, Definitions

and Conventions. *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* . 2000, 363 – 370.

[75]R. P. Buck, E. Lindner. Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes. *International Union of Pure and Applied Chemistry*. 1994, Vol. 66, 2527 - 2536.

[76]R. Buck, V.V. Cosofret. Recommended procedures for calibration of ion-selective electrodes. *International Union of Pure and Applied Chemistry*. 1993, Vol. 65, 1849-1858.

[77]Y. Umezawa, K. Umezawa, H. Sato. Selectivity coefficients for ion-selective electrodes: recommended methods for reporting $K_{potA,B}$ values. *International union of pure and applied chemistry*. 1995, Vol. 67, 507 - 518.

[78] Y. Umezawa, P. Buhlmann, K. Umezawa, et al. Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes Part I. Inorganic cations - (Technical report). *Pure and Applied Chemistry* . 2000, Vol. 72, 1851-2082.

[79] E. Blinka, K. Loeffler, Y. Hu, et al. Enhanced microcontact printing of proteins on nanoporous silica surface. *Nanotechnology*. 2010, Vol. 21.