



Desenvolvimento de um biossensor para Ácido Glutâmico.

ANA MARGARIDA DUARTE GOMES

Novembro de 2015



Desenvolvimento de um biossensor para Ácido Glutâmico

Ana Margarida Duarte Gomes

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

Orientação: Doutora Goreti Sales
Co-orientação: Mestre Ana Moreira

Outubro 2015

Agradecimentos

À doutora Goreti Sales por me ter recebido no Biomark, por toda a ajuda e pela partilha de conhecimento desde o início.

À Ana Moreira por toda a dedicação, ajuda e disponibilidade dados desde o início na concretização deste trabalho.

À equipa Biomark por toda a disponibilidade em ajudar sempre que solicitei.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem apesar de nem sempre compreenderem as minhas opções e por me deixarem seguir os meus sonhos.

Ao meu irmão, por toda a flexibilidade, para que eu conseguisse estar presente no Biomark.

Aos amigos que a praxe da ESTSP me deu, desde os mais antigos aos mais recentes, pelo apoio e compreensão que sempre tiveram para comigo.

Aos meus amigos por acreditarem em mim e que eu seria capaz de ir até aos fim apesar dos obstáculos.

Resumo

A presente dissertação tem com objetivo o desenvolvimento de um biossensor com base nos polímeros de impressão molecular para a deteção de uma molécula alvo, o ácido glutâmico que é convertido em glutamina pela glutamina sintetase, recorrendo à potenciometria. Nas células neoplásicas a glutamina não é sintetizada podendo-se considerar que o ácido glutâmico é um potencial agente anti-cancro.

A técnica de impressão molecular utilizada foi a polimerização em *bulk*, combinando a acrilamida e a bis acrilamida com o ácido glutâmico. Para se verificar se a resposta potenciométrica obtida era de facto da molécula alvo foram preparados em paralelo com os sensores, materiais de controlo, ou seja, moléculas sem impressão molecular (NIP). Para se controlar a constituição química dos vários sensores nomeadamente, do NIP e do polímero de impressão molecular (MIP) antes e após a remoção bem como a molécula foram realizados estudos de Espectroscopia de Infravermelhos de Transformada de Fourier (FTIR), *Scanning electron microscope* (SEM) e Espectroscopia de Raios X por dispersão em energia (EDS).

Os materiais desenvolvidos foram aplicados em várias membranas que diferiam umas das outras, sendo seletivas ao ião. A avaliação das características gerais das membranas baseou-se na análise das curvas de calibração, conseguidas em meios com pHs diferentes, comparando os vários eléctrodos. O pH 5 foi o que apresentou melhor resultado, associado a uma membrana que continha um aditivo, o p-tetra-octilphenol, e com o sensor com percentagem de 3%.

Posto isto, testou-se em material biológico, urina, com as melhores características quer em termos de sensibilidade (18,32mV/década) quer em termos de linearidade ($1,6 \times 10^{-6}$ a $1,48 \times 10^{-3}$ mol/L). Verificou-se ainda que aplicando iões interferentes na solução, estes não interferem nesta, podendo ser aplicados na amostra sem que haja alteração na resposta potenciométrica. O eléctrodo é capaz de distinguir o ácido glutâmico dos restantes iões presentes na solução.

Palavras-chave: Polímero de impressão molecular, ácido glutâmico, potenciometria, polimerização em *bulk*, eléctrodos seletivos.

Abstract

The aim of this work is the development of biosensor based on molecularly imprinted polymer for detecting a target molecule, glutamic acid that is converted into glutamine by glutamine synthetase, using potentiometry. In neoplastic cells glutamine isn't synthesized so glutamic acid can be considered a potential anticancer agent.

The molecular imprinting technique used was the polymerization in bulk by combining acrylamide and bis acrylamide with glutamic acid. To verify that the potentiometric response obtained was indeed the target molecule were prepared in parallel with the sensors, control materials, with *non molecular imprinting polymers* (NIP). To control the chemical constitution of the various sensors, NIP and the *molecularly imprinted polymer* (MIP) before and after remotion of the molecule were performed by spectroscopy studies of *Fourier Transform Infrared* (FTIR), *Scanning Electron Microscope* (SEM) and *Spectroscopy and X-Ray energy dispersive* (EDS).

The developed materials have been applied in various membranes differing from each other with the selective ion. A review of the general characteristics of the membranes was based on an analysis of the calibration curves obtained in media with different pH values, by comparing the various electrodes. The pH 5 showed the best result associated to a membrane containing an additive, p-tetra-octilphenol, and the sensor percentage of 3%.

It was tested in biological material, urine, with the best characteristics in terms of sensitivity ($\pm 18,32\text{mV} / \text{decade}$) in terms of linearity ($1,6 \times 10^{-6}$ to $1,48 \times 10^{-3}$ moles / L) . It was also found that by applying interfering ions in solution, they do not interfere with this and may be applied to the sample without changing the potentiometric response. The probe is capable of distinguishing the rest of glutamic acid ions present in the solution.

Keywords: Molecular Imprinting Polymer, glutamic acid, potentiometry, polymerization in bulk, selective electrodes.

Lista de abreviaturas

Ac GLU- ácido glutâmico

MIP- *Molecularly Imprinted Polymer*

NIP- *Non- Molecularly Imprinted Polymer*

HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*

ELISA- *Enzima Linked- Immunsorbent Assay*

ESI- *Ion Selective Electrodes*

IUPAC-*International Union of Pure and Applied Chemistry*

FTIR- Transformada de Fourier

SEM- *Scanning electron microscope*

EDS- Espectroscopia de Raios X por dispersão em energia

ATR- Acessório de reflexão total atenuada

LOD- Limite de detecção.

LIRL- Limite inferior de resposta linear

HEPES- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

p-top- p-tetra-octilphenol

APS- Ammonium persulfate

TEMED- Tetramethylethylenediamine

MOPS- Sodium salt buffer grade (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)

PVC- polyvinyl chloride

oNFOE-2-Nitrophenyl octyether

THF- Tetrahidrofurano

TRIS- 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

Índice

1	Capítulo I- Introdução e fundamentos teóricos	1
1.1	Ac GLU.....	1
1.1.1	Métodos de quantificação de ácido glutâmico	2
1.2	Biossensores.....	3
1.2.1	Biossensores de componentes biológico	4
1.3	Polímeros de impressão molecular	5
1.3.1	Técnicas de polimerização.....	6
1.3.2	Biossensores de acordo com a transdução do sinal	9
1.4	Potenciometria	10
1.4.1	Elétrodo de referência.....	11
1.4.2	Elétrodo indicador	12
1.4.3	Aspetos teóricos.....	14
1.4.4	Resposta potenciométrica- características	15
2	Capítulo II- Descrição experimental	21
2.1	Material e equipamentos utilizados	21
2.2	Reagentes e preparação de soluções	23
2.3	Preparação do sensor	24
2.4	Preparação de membranas seletiva	26
2.5	Avaliação comparativa dos eléttodos.	28
2.6	Avaliação da seletividade	29
2.7	Análise da superfície.....	29
2.8	Análise de amostra.....	30
3	Capítulo III- Resultados e discussão	31
3.1	Características gerais de funcionamento dos sensores	31
3.1.1	Material biomimétrico	31
3.1.2	Membranas seletivas.....	31

3.1.3	Efeito do pH	32
3.1.4	Efeito da temperatura.....	38
3.1.5	Percentagem de sensor na membrana seletiva e aditivos.	39
3.1.6	Tempo de resposta, tempo de vida e estabilidade.	46
3.2	Análise fotografica dos sensores.....	47
3.3	Análise da superfície dos materias dos sensores	47
3.3.1	Análise SEM.....	47
3.3.2	Análise EDS	49
3.3.3	Análise FTIR	50
3.4	Análise termogravítica (TG) dos sensores	52
3.4.1	Análise TG.....	52
3.5	Seletividade do sensor	54
3.5.1	Interferentes	56
3.6	Análise de amostras	57
4	Capítulo IV- Conclusões finais.....	58
5	Referências bibliográficas	59

Índice de Figuras

Tabela 1. 1- Eléttodos metálicos.	13
Tabela 1. 2- Tipos de ESIs.....	14
Tabela 2. 1- Reagentes e respetivos fornecedores.....	23
Tabela 2. 2- Reagentes.....	24
Tabela 2. 3- Membranas seletivas e respetivos constituintes.	27
Tabela 2. 4- Membranas seletivas e constituintes.	27
Tabela 3. 1- Melhores resultados dos ESIs em tampão HEPES.....	33
Tabela 3. 2- Melhores resultados dos ESIs em tampão MOPS.....	34
Tabela 3. 3- Melhores resultados dos ESIs em tampão TRIS.	36
Tabela 3. 4- Melhores resultados com 3% de sensor em HEPES.	39
Tabela 3. 5- Melhores resultados com 5% de sensor em HEPES.	41
Tabela 3. 6- Melhores resultados com 7% de sensor em HEPES.	42
Tabela 3. 7- Melhores resultados com 10% de sensor em HEPES.	43
Tabela 3. 8- Melhores resultados de todas as percentagens do sensor p-top.	44
Tabela 3. 9- Melhor resultado do sensor Mip p-top com 3% de sensor.....	45
Tabela 3. 10- Resultados da calibração com urina.	55
Tabela 3. 11- Interferente e respetivo $\log K_{pot}$	56

Índice de Tabelas

Figura 1.1- Representação da estrutura do ácido glutâmico.....	1
Figura 1. 2- Biossensor.....	3
Figura 1. 3- Síntese de polímeros de impressão molecular.	6
Figura 1. 4- Esquema representativo da polimerização em <i>bulk</i>	7
Figura 1. 5- Esquema representativo da polimerização em superfície.	8
Figura 1. 6- Célula eletroquímica de potenciometria.	11
Figura 1. 7- Eléctrodo de referência.	12
Figura 1. 8- Representação gráfica de uma curva de calibração.	16
Figura 1. 9- Representação gráfica do tempo de resposta.	17
Figura 2. 1- Tipo de eléctrodos: A- Eléctrodo de referência; B- Eléctrodo indicador.....	22
Figura 2. 2- Montagem do equipamento e material de potenciometria.....	22
Figura 2. 3- Moagem do MIP.	25
Figura 2. 4- Síntese da molécula impressa.	26
Figura 2. 5- Eléctrodos seletivos ao ácido glutâmico: A- Aplicação da membrana; B- Vista lateral do eléctrodo seletivo.	29
Figura 3. 1- Curvas de calibração do tampão HEPES.....	33
Figura 3. 2- Curvas de calibração do tampão MOPS.	35
Figura 3. 3- Curvas de calibração do tampão TRIS.	36
Figura 3. 4- Curvas de calibração dos três tampões.	37
Figura 3. 5- Curvas de calibração ao longo do tempo. A- Resposta potencimétrica às 11:40h; B- Resposta potencimétrica às 15:38h.	38
Figura 3. 6- Curvas de calibração de 3% em HEPES.....	40
Figura 3. 7- Curvas de calibração de 5% em HEPES.....	41
Figura 3. 8- Curvas de calibração de 7% de sensor em HEPES.....	42
Figura 3. 9- Curvas de calibração de 10% de sensor em HEPES.....	43
Figura 3. 10- Curvas de calibração das diferentes percentagens com o sensor p-top. ...	45
Figura 3. 11- Curvas de calibração com MIP p-top 3% em HEPES.	46
Figura 3. 12- Fotografias do sensores: A-NIP; B-MIP após remoção do Ac GLU; C- MIP com Ac GLU.	47
Figura 3. 13- Imagem SEM do MIP antes da remoção.	48

Figura 3. 14- Imagem SEM do MIP após a remoção.	48
Figura 3. 15- Imagem SEM do NIP.	48
Figura 3. 16- Análise EDS do MIP com ácido glutâmico, MIP após a remoção e NIP.	49
Figura 3. 17- Espectro FTIR dos sensores de 3500cm ⁻¹ a 600cm ⁻¹	50
Figura 3. 18- Espectro FTIR dos sensores na gama 1800-600 cm ⁻¹	51
Figura 3. 19- Espectro FTIR dos sensores na gama 4000-1700cm ⁻¹	51
Figura 3. 20- Análise termogravítica dos diferentes sensores.	53
Figura 3. 21- Curvas de calibração de MIP p-top 3% em urina.	55
Figura 3. 22- Gráfico dos interferentes.	57

1 Capítulo I- Introdução e fundamentos teóricos

Este capítulo pretende abordar todos os temas necessários para a elaboração do presente trabalho. Neste sentido, descreveu-se a molécula escolhida, o ácido glutâmico (Ac GLU), e os aspectos relevantes sobre esta molécula. Além disso, foi feita uma abordagem sobre os biossensores mais importantes e dos processos envolvidos para o seu desenvolvimento neste trabalho.

1.1 Ac GLU

O Ac GLU ($C_5H_9NO_4$) é um aminoácido não essencial, biodegradável, não tóxico e comestível para o ser humano^[1]. É também o neurotransmissor mais comum no sistema nervoso central. Estruturalmente pode ser representado da seguinte forma (Figura 1.1):

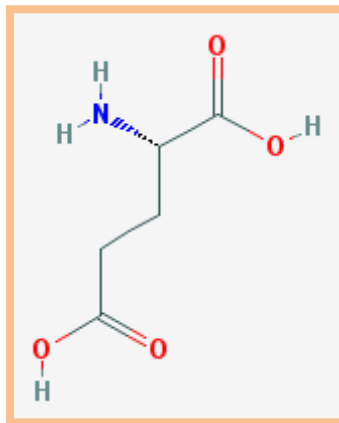


Figura 1.1- Representação da estrutura do ácido glutâmico.

O Ac GLU é convertido em glutamina pela glutamina sintetase^[2]. A glutamina nas células neoplásicas não é sintetizada pelo facto da glutamina sintetase ter uma reatividade mais baixa que em células normais. Desta forma, um antagonista da referida enzima interferirá com o metabolismo da glutamina podendo ser um agente anti-cancro^[3]. O Ac GLU é portanto usado como conjugado de fármacos anti-cancerígenos uma vez que provoca um aumento da eficiência do fármaco ao mesmo tempo que diminuí a toxicidade deste^[1]. Sabe-se ainda que o Ac GLU é um agonista do receptor do glutamato que potencia a retenção de memória^[4] e tem uma grande utilidade na diminuição da pressão sanguínea^[5].

1.1.1 Métodos de quantificação de ácido glutâmico

De acordo com a literatura é possível verificar que existem alguns métodos de quantificação do Ac GLU entre os quais, óticos, separativos, bioquímicos.

As técnicas óticas envolvem a interação de radiação eletromagnética (desde os raios gama às ondas rádio) com a matéria. Esta interação provoca fenómenos de refração, polarização, dispersão, emissão, difração, reflexão e absorção. No caso do Ac GLU, na literatura encontra-se descrito métodos óticos baseados em colorimetria^[6]. Esta técnica tem como limitação o facto de uma outra cor de um outro elemento interferir na deteção da molécula pretendida.

Em relação aos métodos separativos, estes separam os constituintes que se pretendem ou até mesmo o interferente antes de se quantificar. Para que tal ocorra, é fundamental que haja uma grande diferença a nível de substância química ou das propriedades físicas do analito ou do interferente. De acordo com a literatura, é possível encontrar trabalhos para este composto que recorrem à técnica de *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*^[7]. Outros tipos de metodologia envolve os métodos bioquímicos, estes centram-se sobretudo na afinidade entre o antigénio e o anticorpo. A transdução pode ser realizada pelos métodos químicos/físicos nos quais se enquadram os métodos referidos anteriormente. Além disso, na literatura são descritos diversos métodos, nomeadamente, *Enzima Linked- Immunosorbent Assay (ELISA)*^{[8][9]} e *Surface Plasmon Resonance (SPR)*^[10]. Geralmente, estes métodos são bastante seletivos pelo facto de terem como base a interação entre antigénio e anticorpo, dependendo sempre da afinidade entre os intervenientes. No que diz respeito aos anticorpos, os métodos envolvidos têm uma estabilidade reduzida associada a elevados tempos de resposta. Além disso, o material biológico não pode ser reutilizado e economicamente é bastante dispendioso, o que torna impraticável em programas de rastreios e medições de rotina em unidades hospitalares.

Assim, um novo método para a deteção do Ac GLU em urina será desenvolvido utilizando a potenciometria. Na literatura não foi encontrado nenhum trabalho relacionado com a deteção do analito em questão através deste método.

1.2 Biossensores

Um biossensor é considerado um dispositivo que recorre a uma combinação entre um componente biológico o qual reage na presença de um determinado analito e um transdutor físico (Figura 1.2). Este transdutor tem como objetivo converter a variação ou mudança físico-química resultante da atividade do elemento biológico num sinal^[11,12]. O biossensor pode combinar a especificidade dos processos de reconhecimento biológico com várias técnicas podendo estas ser de natureza ótica e/ou elétricas.

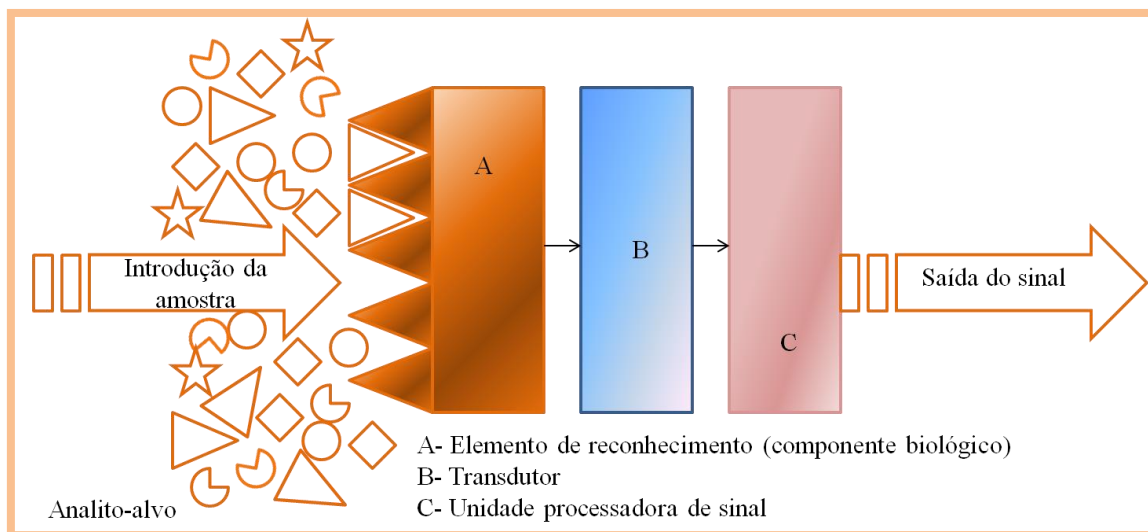


Figura 1. 2- Biossensor.

Analisando a figura anterior pode-se dizer que os biossensores são construídos por um sistema de reconhecimento molecular, um transdutor e uma unidade processadora de sinal^[13]. Esta última consiste num detetor que procede à filtragem, amplificação e análise do sinal que foi convertida. Posteriormente pode ser armazenado num dispositivo ou transferido para um monitor no qual pode possibilitar uma visualização imediata^[12,13].

Os biossensores têm algumas particularidades que levam à sua utilização cada vez mais frequente: facilidade de manipulação, baixo limite de deteção, portabilidade e baixo custo^[14]. Estes podem ser classificados de acordo com a sua especificidade biológica, ou seja, de acordo com o componente biológico ou pelo modo como é efetuada a transdução do sinal.

1.2.1 Biossensores de componentes biológico

No processo de reconhecimento biológico o objetivo principal é proporcionar ao sensor uma maior seletividade na detecção do analito específico com o intuito de evitar possíveis interferências de outros compostos. Para este processo, os biossensores podem utilizar diferentes componentes biológicos imobilizados sobre o seu transdutor, como enzimas, células, tecidos ou sensores de afinidade, com base em anticorpos, recetores de membranas ou ácido nucleicos ^[12,15,16].

1.2.1.1 Biossensores enzimáticos

Este tipo de biossensor tem como elemento de biorreconhecimento uma enzima. As enzimas são utilizadas neste contexto pela sua atividade catalítica sobre o analito-alvo provocando uma alteração do sinal no transdutor. Deste modo, estes biossensores adquirem uma ótima seletividade de acordo com a resposta pretendida. No entanto, apesar de serem altamente seletivos, os biossensores enzimáticos dependem da atividade catalítica do meio envolvente, ou seja, alterando as condições, como por exemplo, o pH ou a temperatura, a enzima pode sofrer alterações na sua atividade catalítica por restrição/alteração da conformação ativa ^[17,18]. Além disso, os reagentes e os produtos utilizados podem ter baixa solubilidade em meios biológicos e apresentarem dificuldades na recuperação das enzimas a partir das próprias reações e das reações secundárias que podem ser desencadeadas e que são indesejadas ^[17,18].

1.2.1.2 Imunossensores.

Os imunossensores consistem na ligação de um antígeno e o seu anticorpo sendo altamente específicos no reconhecimento molecular, de forma a criar um complexo estável entre eles ^[19]. Estes biossensores recorrem a condições na qual a sua detecção é conseguida com o mínimo de interações não-específicas. Os mecanismos de detecção da interação anticorpo-antígeno podem ser indiretos ou diretos. Para esse mecanismo recorre-se a um marcador enzimático que é acoplado ao antígeno ou ao anticorpo com a finalidade de aumentar a sensibilidade dos imunossensores ^[20,21].

1.3 Polímeros de impressão molecular

A impressão molecular é uma técnica que consiste na formação de polímeros com propriedades específicas de reconhecimento molecular que são adquiridas pela impressão de uma molécula numa estrutura rígida^[22,23]. Esta técnica permite sintetizar polímeros de impressão molecular (MIP, do inglês *molecularly imprinted polymer*), no qual ocorre a formação de um complexo entre monómeros funcionais e a molécula, que serve de molde. Numa primeira fase, a molécula molde interage com as moléculas de um monómero, por meio de uma ligação covalente ou não covalente^[24]. Na abordagem covalente a molécula molde é acoplada a um monómero de forma covalente, dependendo de ligações covalentes irreversíveis. Assim, durante o processo de reconhecimento molecular é esperado que a molécula estabeleça uma ligação covalente com o polímero. Apesar de ser expectável que apresente locais de reconhecimento bem definidos, esta abordagem pode apresentar um número limitado de ligações covalentes que apresentem as características pretendidas. No que diz respeito à abordagem não-covalente, este método é mais popular para a preparação do MIP pois envolve a associação dos monómeros funcionais à molécula de forma não covalente, ou seja, a molécula é misturada juntamente com os monómeros funcionais ocorrendo posteriormente a polimerização^[25,26,27,28]. A polimerização dos monómeros ocorre na presença de um agente de reticulação que promove ligações cruzadas entre as moléculas do monómero e de um iniciador, tipicamente radicalar, de forma a iniciar a reação que origina a formação de uma rede tridimensional. No final, essa molécula é removida sem que a geometria dessa estrutura seja alterada, originando assim um MIP. O MIP obtido permite efetuar o reconhecimento da molécula removida, pois dispõe de cavidades com tamanhos e formas complementares a essa molécula, mantendo assim a capacidade de reter seletivamente essa mesma molécula presente numa amostra, como é possível visualizar na Figura 1.3 :

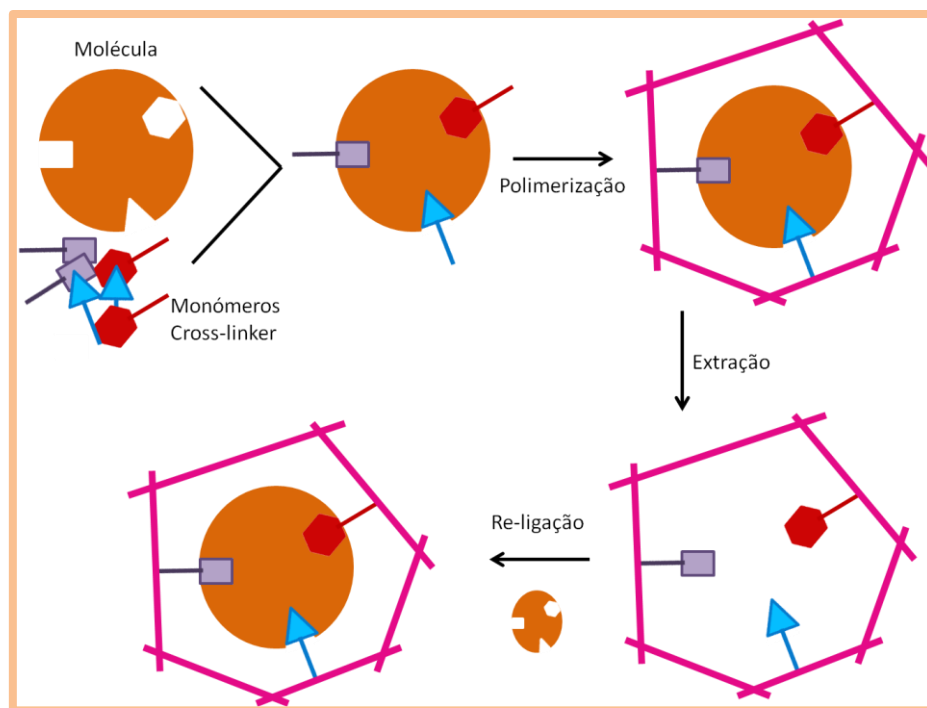


Figura 1. 3- Síntese de polímeros de impressão molecular.

De uma forma geral, os MIPs possuem uma boa estabilidade química e térmica podendo ser usados em meios mais agressivos. Comparativamente com outros elementos de biorreconhecimento, os MIPs apresentam um custo mais baixo, preparação simples, estáveis, podendo ser reutilizados. Estes apresentam ainda resistência mecânica elevada^[29].

A síntese dos MIPs pode ser realizada utilizando diferentes métodos de polimerização.

1.3.1 Técnicas de polimerização

Atualmente, os MIPs podem ser preparados por múltiplas formas sendo escolhido o processo que melhor se adequa ao pretendido: polimerização em *bulk*, polimerização de superfície, polimerização de suspensão, polimerização *multi-step swelling*, polimerização de precipitação e polimerização *in situ*.

De todos estes métodos referidos anteriormente, os mais comuns são a polimerização em *bulk* e a de superfície que serão descritas de forma pormenorizada seguidamente.

1.3.1.1 Polimerização em *bulk*

A polimerização em *bulk* é a mais utilizada entre todas as técnicas de preparação de MIPs. O processo inicia com a adição do iniciador de radical livre a uma solução que contém um ou mais monómeros que se encontram juntamente com a molécula alvo. A remoção do molde, de forma geral é realizada por extração ou por hidrólise, ficando locais vazios com tamanho e forma da molécula molde. Posteriormente, o polímero é pulverizado e peneirado para que sejam produzidas partículas de recetores com o tamanho mais indicado^[30,31].

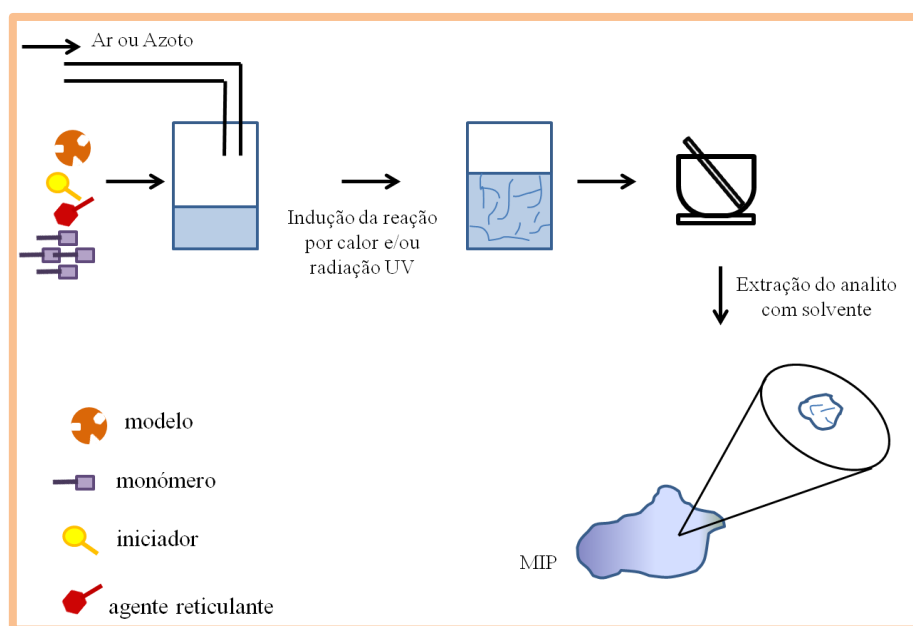


Figura 1. 4- Esquema representativo da polimerização em *bulk*.

Esta técnica produz grandes quantidades de material biomimétrico, ao mesmo tempo que é bastante simples de se afetuar laboratorialmente. Por outro lado, a polimerização em *bulk*, é bastante mais rápida quando comparada com a de superfície, pois durante a síntese do MIP a molécula alvo pode estar distribuída em torno da matriz polimérica independentemente do tempo de polimerização. Assim a sua remoção é conseguida, formando-se locais de ligação em torno da matriz polimérica. Com isto apresenta maior seletividade e a sensibilidade ocorrendo uma maior transferência de massa mais rápida. Por estas razões mencionadas e como Ac GLU é molécula de pequenas dimensões quando comparado com as proteínas, optou-se por esta técnica de polimerização.

Para a quantificação da concentração da molécula em estudo pode-se recorrer a diferentes métodos de transdução^[32].

1.3.1.2 Polimerização em superfície.

A polimerização em superfície é mais direcionada quando se pretende imprimir moléculas de maiores dimensões como é o caso das proteínas^[33].

Neste tipo de polimerização, é na superfície do polímero que se encontram os locais de ligação impressos. Nesta abordagem numa primeira fase liga-se o modelo da molécula sobre a superfície plana ou esférica de um substrato, e só posteriormente se dá a polimerização^[34].

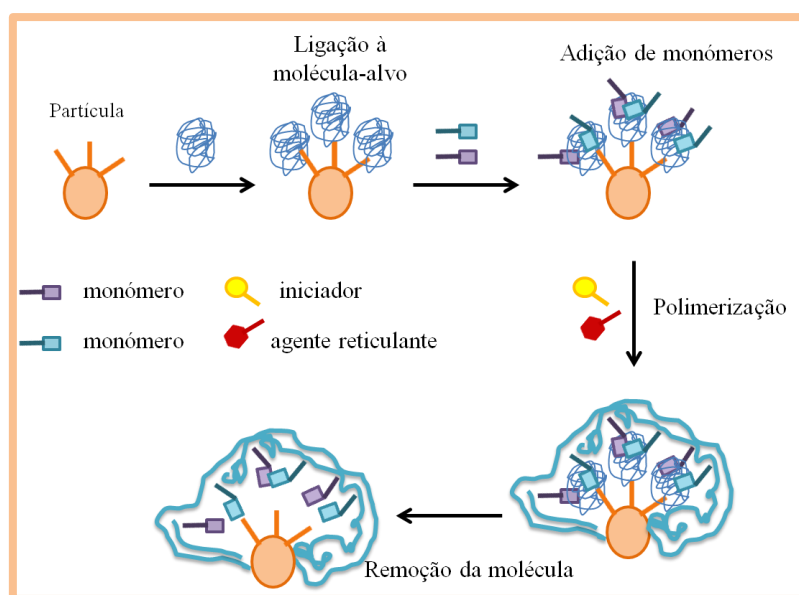


Figura 1. 5- Esquema representativo da polimerização em superfície.

Esta polimerização necessita de poucos recursos em termos de reagentes, porque a quantidade de moléculas molde necessárias é muito menor, sendo portanto bastante rentável, no caso das proteínas. Contudo, é necessário um maior controlo da polimerização, uma vez que, as moléculas podem ficar totalmente revestidas pelo polímero formado. Consequentemente, não se formam locais de ligação à superfície, uma vez que a remoção da molécula pode não ser alcançada devido à espessura da matriz polimérica. Assim esta técnica pode não ser a mais indicada para moléculas com tamanho inferior às da proteína, pois os locais de ligação podem não ser preservados tornando-se pouco selectivo e sensível à molécula alvo. Além disso, requer mais tempo de síntese do próprio MIP^[31].

1.3.2 Biossensores de acordo com a transdução do sinal

O transdutor é o interface que mede qualquer mudança química ou física na reação com o biorreceptor. Transforma a energia em algo que possa ser mensurável tal como luz, carga, calor ou massa. Os transdutores podem ser: calorimétrico, óptico, electroquímico ou piezoeléctrico^[12,15,35].

1.3.2.1 Calorimétrico

A deteção de calor proveniente das reações bioquímicas é feita através da interação entre o analito e o componente biológico. Regra geral, o analito e o componente biológico estão diretamente acoplados ao calorimétrico, sendo uma das formas de reduzir as perdas de calor que diminuem a sensibilidade (a grande maioria do calor gerado nas reações enzimáticas é perdida para o meio)^[36]. Pode também ter o nome de termistor^[37].

1.3.2.2 Óptico

Neste tipo de biossensor é efetuada a medição de luz que é observada ou emitida, resultante de uma reação biológica ou química. Recorre a fibras ópticas para o encaminhamento das ondas de luz para os detetores mais indicados (eléctrodo ou semi-condutor). É aplicado sobretudo em sistemas de deteção directa^[36].

1.3.2.3 Piezoeléctricos

Tem como princípio o revestimento da superfície do biossensor ter uma substância que seja biologicamente ativa que se liga de forma selectiva: A superfície que foi revestida é colocada numa solução que contém analitos para que estes se liguem à substância, provocando um aumento da massa do cristal que proporcionalmente diminuí a frequência de ressonância das oscilações^[36].

1.3.2.4 Electroquímico

É utilizado maioritariamente como recurso no diagnóstico de análises clínicas e em testes de monitorização^[36]. Há movimento de iões e ocorre difusão de actividades eléctricas^[38]. Podem ser divididos em três tipos: potenciométricos, amperométricos e condutimétricos^[36].

- **Amperométricos:** Medição da corrente gerada pela redução ou oxidação eletroquímica da espécie eletroactiva, onde há transferência de eletrões entre o eléctrodo e o analito nos dois sentidos. Aplicando um potencial eléctrico no eléctrodo e através das propriedades do analito pode-se “controlar” a direcção do fluxo dos eletrões^[39,40].

- **Conduzimétricos:** Medição das mudanças de condutividade. É necessário o recurso a enzimas que catalisando provocam a produção ou consumição de espécies iónicas, levando a alterações na quantidade dos portadores de carga móvel no eletrólito^[39,41].

- **Potenciométricos:** Determinação da diferença de potencial entre o eléctrodo de referência e o eléctrodo utilizado como indicador. Em vez de dois eléctrodos distintos podem ser usados dois de referência, devidamente separados por uma membrana seletiva permeável, desde que não haja fluxo de corrente com valores significativos^[40].

1.4 Potenciometria

A técnica eletroquímica que relaciona a diferença de potencial medida por dois eléctrodos, um de referência e outro indicador, numa célula eletroquímica (Figura 1.6), tem o nome de potenciometria. A potenciometria é um método onde não é necessária transferência de corrente electrónica sendo esta nula ou quase nula. O eléctrodo de referência tem o seu potencial sempre constante. Por outro lado, o eléctrodo indicador tem uma variação do potencial conforme a solução em estudo^[21,40].

No caso da potenciometria, os elétrodos de referência que mais se utilizam são os de calomelanos (mercúrio/cloreto de mercúrio), os de talamida (cloreto de tálio/amálgama de tálio), os de padrão de hidrogénio e os de cloreto de prata/prata^[42]. Estes últimos são os mais utilizados pelo facto de os seus materiais serem pouco dispendiosos e serem bastante fáceis de construir. Os elétrodos de referência de cloreto de prata/prata têm na sua constituição um fio de prata que é revestido por uma camada fina de cloreto de prata. O referido fio encontra-se emergido numa solução aquosa de cloreto de potássio e cloreto de prata com uma dada concentração^[43]. Este eléctrodo de referência que se está a tratar é um eléctrodo de segunda espécie: o potencial que é gerado por ele não está dependente do seu principal composto, a prata, mas da concentração do cloreto^[43].

Assim, para que o eléctrodo de referência esteja a funcionar corretamente e sem perda de desempenho, a manutenção da concentração do cloreto é um fator determinante^[43].

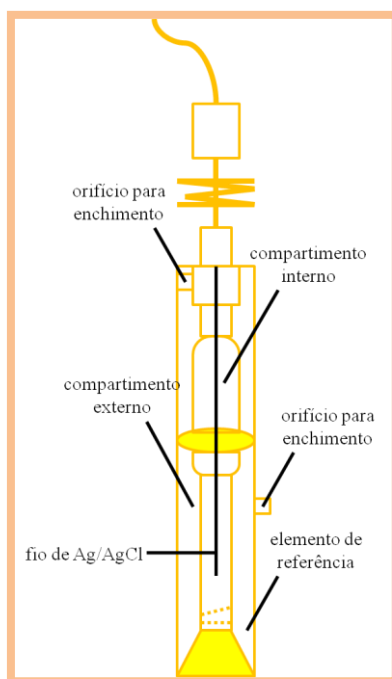


Figura 1. 7- Eléctrodo de referência.

1.4.2 Eléctrodo indicador

O eléctrodo indicador deve estar sempre interligado ao eléctrodo de referência pois só assim será possível a medição do potencial do primeiro^[42]. De uma forma muito sucinta, o eléctrodo indicador pode ser definido como sendo um eléctrodo sensível ao analito que se pretende estudar, no qual o seu potencial varia em função da sua concentração na amostra presente. Para que as potencialidades do eléctrodo indicador sejam exploradas ao

máximo, este deve ser bastante sensível ao analito, ter uma resposta rápida à deteção de variação de concentração e ter um elevado grau de reprodutibilidade^[42].

Pode-se dividir estes elétrodos em dois grupos, os elétrodos metálicos e os *Ion Selective Electrodes* (ESIs). A tabela seguinte (Tabela 1.1) remete para os tipos de elétrodos metálicos e algumas considerações acerca destes^[42]:

Tabela 1. 1- Elétrodos metálicos.

Tipo de eléctrodo metálico	Considerações
Primeira classe	Medição da atividade de um ião metálico numa solução
Segunda classe	Medição de um ligante ou de um anião
Terceira classe	Baixa seletividade
Inertes	Sistema oxidação-redução em contacto com o metal inerte (platina ou ouro p.e.)

Além disso, os ESIs podem ser divididos em cristalinos e não cristalinos. Os ESIs cristalinos ainda agrupam os homogéneos e os heterogéneos. A tabela seguinte (Tabela 1.2) ilustra as principais diferenças entre estes dois grupos^[42,44]:

Tabela 1. 2- Tipos de ESIs.

Tipo de ESIs		
Cristalinos	Homógeneos	Membrana cristalina preparada apartir de um único composto ou por uma mistura homogénea.
	Heterogéneos	Membrana formada através de uma substância ou mistura de substâncias, conseguida pela junção de uma matriz inerte.
Não Cristalinos	Vidro	Membrana de deteção de vidro com composição química que determina a seletividade desta
	Com zonas móveis	Compostos por permutador, solvente mediador e matriz de incorporação; Permutador- material eletroquímico responsável pela resposta do eletrodo; Matriz de incorporação- polímeros em que as características da borracha é dependente de um solvente mediador plastificante.

De uma forma geral, este tipo de eléctrodo tem por base um elemento de reconhecimento (membrana) que contém materiais condutores compostos por iões de permeabilidade seletiva, separando a amostra do interior do eléctrodo. Os ESIs e os *Field Effect Transistors* (FET) são uns bons exemplos deste tipo de eléctrodos. Para que as membranas sejam mais eficientes, estas devem ter uma interação seletiva com o analito em estudo, uma solubilidade mais baixa e ter uma boa condutividade eléctrica. Os eléctrodos seletivos de membrana, sendo seletivos ao ião, os custos com a sua construção são baixos, sensíveis e aplicáveis numa vasta gama de experiências, que levam a uma redução dos custos e do tempo despendido nos estudos que envolvam este tipo de eléctrodos^[42,45,46].

Este tipo de eléctrodo não altera com a cor nem a turvação da amostra em estudo e são bastante fáceis de manipular e construir no laboratório face a outros. Por ultimo, os ESIs apresentam uma resposta potenciométrica seletiva, precisa, exata, direta e simples^[46].

1.4.3 Aspetos teóricos

Segundo um das recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) em 1994, a diferença de potencial que é medida entre a atividade do analito na solução e o potencial que é desenvolvido no ESI relacionam-se de forma

linear e dependentes do logaritmo da atividade do analito em estudo na solução. Esta relação pode ser definida pela equação de Nernst-Nicolski (Equação 1.1):

$$E = \text{"constante"} + \frac{2,303RT}{Z_{AF}} \times \log A_a \quad (1.1)$$

onde:

E: valor experimental de um ESI (mV);

“constante”: potencial normal do ESI, potencial do eletrodo de referência e potencial de junção líquida;

R: constante dos gases perfeitos (8.3144 J/(Kxmol));

T: temperatura termodinâmica;

Z_A : carga do analito;

F: constante de Faraday (9.64846×10^4 C/mol);

a_A : atividade do analito^[47].

A força iônica I é dada como sendo a intensidade do campo elétrico provocado pelos íons presentes na solução (Equação 1.2). Utilizando a concentração do analito em detrimento da atividade deste (equação de Nernst-Nicolski) é possível chegar-se à equação da força iônica:

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

onde:

C_i : concentração do analito (mol L^{-1});

Z_i : carga do analito^[47].

1.4.4 Resposta potenciométrica- características

1.4.4.1 Curvas de calibração

A curva de calibração (Figura 1.8) representa a atividade de um determinado íon em função da diferença de potencial entre o ESI e eletrodo de referência. Desta curva que se obtém pode-se depreender várias informações acerca da resposta potenciométrica entre elas:

- **LOD**- Limite de detecção: valor da concentração ou atividade de um determinado íão no ponto onde os segmentos com o comportamento linear ou não linear se interceptam. Pode ser condicionado pela composição da solução, a velocidade da agitação da solução ou utilização do anterior elétrodo.
- **LIRL**- Limite inferior de resposta linear: valor da concentração ou atividade de um determinado íão onde a resposta potenciométrica se torna linear.
- **Declive**- Qualidade da resposta do elétrodo em condições normais de pressão e temperatura. A inclinação é positiva e ronda o valor de 59,16 mV/década^[44,48].

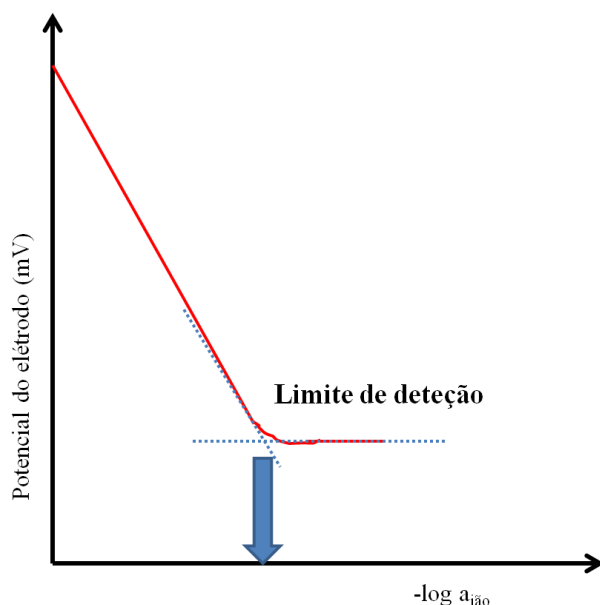


Figura 1. 8- Representação gráfica de uma curva de calibração.

1.4.4.2 Tempo de resposta

O tempo de resposta (Figura 1.9) é calculado desde que o elétrodo de referência e o ESI são colocados na amostra ou apartir do momento em que a atividade do íão em estudo se altera e o instante inicial em que o declive $\Delta E/\Delta t$ fica igual ao tempo limite que foi estabelecido (Δt) tendo em conta a exatidão que se pretende^[48].

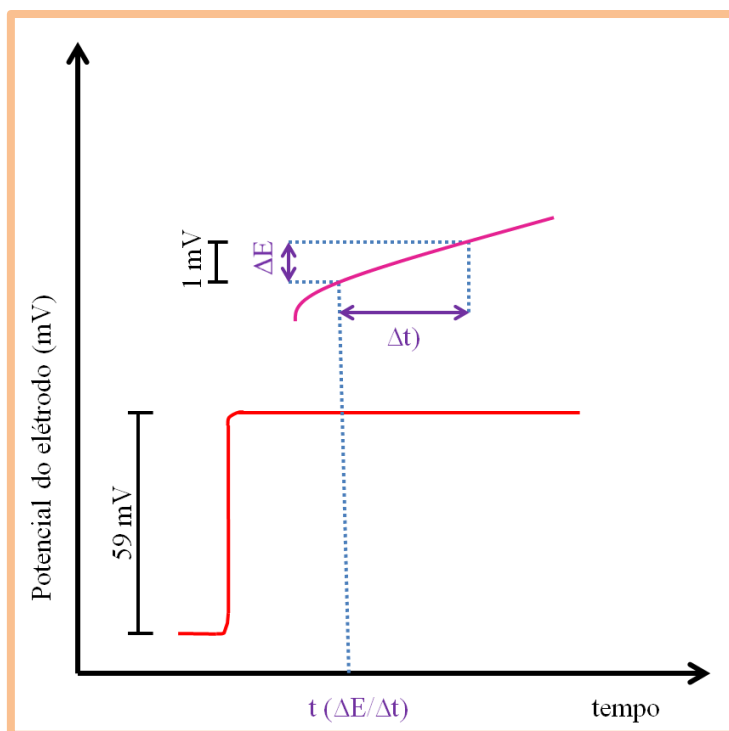


Figura 1. 9- Representação gráfica do tempo de resposta.

1.4.4.3 Efeito do pH

Apesar de qualquer ESI detectar íões para o qual são seletivos, por vezes outros íões presentes na solução interferem na resposta potenciométrica. Todas as soluções aquosas contêm um protão e um anião hidróxilo entre as várias espécies presentes. Este protão e anião hidróxilo influenciam diretamente a resposta do ESI seletivo. Além disso, a concentração destas duas espécies condiciona a carga da espécie que se pretende medir, uma vez que o grau de ionização varia consoante o pH. Por esta razão, é bastante importante que se utilize soluções padrão e de amostragem com o mesmo pH, escolhido de forma que haja a menor inferência possível na leitura potenciométrica. Para que tal ocorra é fundamental que seja identificado um intervalo de valores de pH onde o sinal do ESI seja independente do pH das soluções. Assim, é efetuado um estudo com soluções com diferentes pHs de forma a identificar qual o que melhor se adequa.

1.4.4.4 Seletividade

A seletividade de um eletrodo pode ser definida como sendo a capacidade que o ESI tem em diferenciar o íão que se pretende dos outros na mesma solução. Pode ser calculada pelo coeficiente de seletividade potenciométrica $K_{A,B}^{pot}$ e calculado tendo em conta a resposta potenciométrica do ESI do íão principal A e o interferente B. A

atividade do íon principal A e do íon interferente B pode ser definida pela equação de Nikolsky-Eisenman (Equação 1.3):

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

onde:

E- valor experimental (mV);

constante- potencial do eletrodo de referencia, potencial normal do eletrodo seletivo e potencial de junção líquida (mV);

R- constante dos gases perfeitos ($8,64846 \times 10^4$ J/(K x mol));

T- temperatura (K);

Z_A - valor inteiro da magnitude e do sinal da carga do principal íon

Z_B - valor inteiro da magnitude e do sinal da carga do íon interferente;

F- constante de Faraday ($9,64846 \times 10^4$ C/mol);

a_A - atividade do íon principal (mol/L ou mol/Kg)

a_B - atividade do íon interferente (mol/L ou mol/Kg)

K- coeficiente de seletividade em relação ao íon interferente^[48].

Quando o íon interferente está presente na solução, a resposta potenciométrica altera-se. Em termos práticos, sabendo o valor do LOD é possível a verificação do grau de alteração da resposta. Isto deve-se ao aumento da resposta potenciométrica (aumento do sinal de base) provocada pelo íon interferente, levando a que o íon principal só seja detetado mais tardiamente, em concentrações superiores.

Em termos numéricos, é possível determinar os coeficientes de seletividade potenciométrica recorrendo a três métodos que serão descritos mais adiante: método das soluções separadas, método das soluções mistas e o método matched potential^[48].

○ **Método as soluções separadas**- comparação entre os potenciais de uma célula ESI imergida numa amostra de íon principal (A) e numa outra amostra de íon interferente (B), ambas com as mesmas condições. O valor de coeficiente seletividade potenciométrico pode ser obtido através da Equação 1.4 :

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

Teoricamente, o valor de $(Z_A F)/(2,303RT)$ é interpretado como sendo o inverso do declive teórico de um ESI. Assim sendo, corresponde ao declive da curva de calibração que se obtém da célula potenciométrica nos ensaios laboratoriais.

Este método torna-se bastante desvantajoso, pois como foi referido anteriormente, o ião principal e o interferente não se encontram na mesma solução, não havendo competição entre eles. Na realidade, estes dois diferentes iões encontram-se juntos, não sendo portanto dados muito próximos do que verdadeiramente acontece^[48,49].

○ **Método das soluções mistas**- Diferenças de potencial entre os eletrodos de referência e o ESI medidas na solução que contém a concentração constantes dos iões interferentes, variando apenas a concentração do ião principal. Neste caso, para se calcular o coeficiente de seletividade potenciométrico aplica-se a Equação 1.5 :

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

O inverso também pode ser aplicado, ou seja, mantém-se constante a concentração do ião principal, havendo alteração na concentração do ião interferente. Essa alteração é feita por adição deste, até que ocorra uma resposta potenciométrica linear. Neste caso não se consegue aplicar a equação de Nernst e o ião interferente não consegue obter um potencial similar ao do ião principal^[48,49].

○ **Método *matched potential***- determinação da atividade do ião interferente que tem a variação de potencial igual à do ião principal numa amostra de referência. Para ser determinado o coeficiente de seletividade potenciométrico aplicado neste método pode-se utilizar a Equação 1.6:

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

São utilizadas para esta equação anterior duas medidas potenciométricas distintas. Uma delas trata-se da variação de potencial resultante do aumento da concentração do íon em estudo desde que a sua atividade é menor (a_A) até ser maior (a'_A). A outra medida potenciométrica é a concentração do íon interferente que se adicionou a a_A para que se observe a diferença de potencial referida.

Este último método é o que mais se assemelha a um ensaio de seletividade apesar de não ter nenhuma relação com os fundamentos teóricos depreendidos da equação de Nernst^[48,49].

Estes três métodos não apresentam valores coerentes entre eles, não podendo-se afirmar com exatidão qual o valor de coeficiente de seletividade potenciométrica. Assim, deve-se ter em conta que estes valores são meramente orientadores para o grau de seletividade de um ESI^[49].

2 Capítulo II- Descrição experimental

Este capítulo tem como objetivo a descrição da componente experimental do trabalho realizado associado à preparação do biossensor do Ac GLU, evidenciando todo o procedimento necessário. Além disso, é abordado os equipamentos, materiais assim como os reagentes envolvidos em todo o processo

2.1 Material e equipamentos utilizados

Os reagentes sólidos foram pesados na balança *RADWAG XA 110/X* cuja precisão é de $\pm 0.0001\text{g}$.

As soluções que requeriam uma medição mais precisa foram preparadas em balões volumétricos de classe A com volumes entre 25 e 250 mL. No entanto, a preparação de volumes inferiores, nomeadamente, inferior a 5 mL, foram medidos com recurso a micropipetas automáticas de volume ajustável da marca *Biohit* e *Eppendorf*. O equipamento de banho de ultrassons termostatizado que foi utilizado durante o processo de polimerização foi o *BANDELIN Sonorex Digitec*.

A medição da potenciometria necessitou de dois elétrodos diferentes: um de referência e um eletrodo indicador. O eletrodo de referência utilizado foi o *Orion™ 900200 Sure-Flow™* (Figura 2.1A). O eletrodo indicador usado foi o ESI seletivo ao ácido glutâmico (Figura 2.2B) previamente preparado com um corpo de uma seringa de 1 mL, em que na ponta mais estreita foi colocada uma pasta condutora de grafite, constituída por araldite, endurecedor e grafite. Posteriormente foi depositada a membrana seletiva para a molécula nessa superfície condutora.

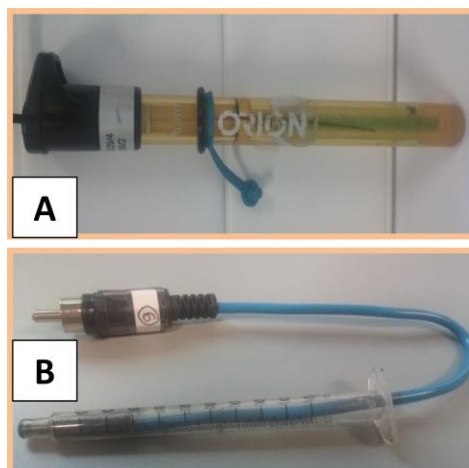


Figura 2. 1- Tipo de elétrodos: A- Elétrodo de referência; B- Elétrodo indicador.

O equipamento de medição de potenciometria foi o decimilivoltímetro *Crison μ pH GLP 21* com sensibilidade $\pm 0.1\text{mV}$. A recolha dos dados foi efetuada à temperatura ambiente e com agitação contínua através do agitador incorporado no equipamento. Este equipamento contém acoplado uma caixa de comutação com seis entradas disponíveis, permitindo assim a leitura simultânea máxima de seis elétrodos indicadores durante todo o ensaio potenciométrico. A montagem do equipamento pode ser visualizada na Figura 2.2:

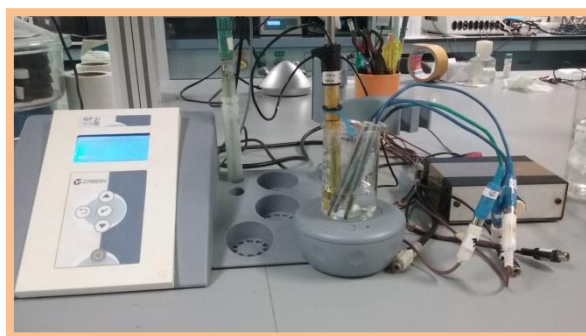


Figura 2. 2- Montagem do equipamento e material de potenciometria.

Além disso, procedeu-se à análise morfológica e química da superfície dos sensores, a fim de verificar se existiam diferenças entre os diferentes sensores, através da análise *Scanning Electron Microscope (SEM)* e Espectroscopia de Raios X por dispersão em energia (EDS) com o equipamento *Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M*.

Uma outra técnica baseada na análise termogravítica (TG) dos sensores foi efetuada para comprovar termicamente os diferentes compostos químicos presentes em cada sensor. Para taal utilizou-se o equipamento da *Hitachi TG/DTA 7200*.

2.2 Reagentes e preparação de soluções

A Tabela 2.1 refere-se aos vários reagentes necessários no desenrolar do trabalho e o seu fornecedor correspondente:

Tabela 2. 1- Reagentes e respetivos fornecedores.

Reagente	Fornecedor
Ac GLU Acrilamida Metileno Bis Acrilamida (4-(2-hydroxyethyl)-1- Piperazineethanesulfonic acid)- HEPES p-tetra-octilphenol- p-top	SIGMA
Ammonium persulfate- APS	Analar
Tetramethylethylenediamine- TEMED	TCI
Ácido acético	Analar Normapur
Sodium salt buffer grade (3-(N- morpholino)propanesulfonic acid)- MOPS	AppliChem
2-Amino-2-hydroxymethyl-propane- 1,3-diol- TRIS Polyvinyl chloride- PVC	Fisher BioReagents
2-Nitrophenyl octyether-oNFOE Potassium tetrakis (4-clorophenyl) borate- ptcb	Fluka
Tetrahidrofurano- THF	Riedel-DeHaen
p-tetra-octilammonium bromide- p-tob	Acros

A água utilizada em várias soluções como solvente foi água ultrapura com condutividade correspondente inferior a 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$. A concentração da solução-padrão

de Ac GLU preparada em tampão foi de 4×10^{-3} mol/L. As soluções dos diferentes tampões HEPES, MOPS e TRIS foram preparadas com uma concentração de 1×10^{-3} mol/L. As soluções das espécies interferentes, nomeadamente ureia, creatinina, glucose e ácido ascórbico foram preparadas com uma concentração de 2 mol/L, 30 mol/L, 1.5 mol/L e 6.70 mol/L respetivamente. A urina humana foi diluída $100 \times$ no tampão HEPES.

2.3 Preparação do sensor

A técnica de impressão molecular de polímeros utilizada foi a polimerização em *bulk*. O MIP que se obteve tinha as condições descritas na Tabela 2.2:

Tabela 2. 2- Reagentes.

	Reagente	Quantidade
Molécula	Ac GLU	73.55mg
Agente reticulante	Acrilamida	44.4mg
Monómero	Bis acrilamida	385.425mg
Iniciador	APS	28.5mg
Catalizador	TEMED	0,15mL
Solvente	água	25mL

Assim, adicionou-se o Ac GLU, a bis acrilamida e a acrilamida a 25mL de água ultrapura de forma a dissolver todos os componentes. De forma, a dissolver completamente todos os compostos, colocou-se a solução nos ultrassons durante cerca de 10 min, seguindo-se posteriormente ao desarejamento da mesma com azoto durante aproximadamente 5 min. Este procedimento favorece a polimerização, tornando a síntese dos materiais poliméricos num processo mais rápido. Para iniciar a reação de polimerização, juntou-se o APS, seguido de um agente catalisador, TEMED com uma concentração que promove uma reação mais rápida. Após a junção de todos os reagentes envolvidos colocou-se a solução na placa de aquecimento durante cerca de 2 horas à temperatura de 80°C ocorrendo a polimerização. A solução obtida foi colocada

na estufa para secagem desta, passando posteriormente pelo processo de moagem (Figura 2.4), ficando em pó.



Figura 2. 3- Moagem do MIP.

Uma vez seco o polímero é efetuado a remoção da molécula, no qual foi utilizado uma solução de água ultrapura que contém 10% de ácido acético ficando a solução sob agitação *overnight*. Finalmente, procede-se à lavagem do MIP, onde a solução é centrifugada de forma a remover o sobrenadante que contém a molécula removida e possivelmente alguns monómeros que não tenham reagido. Este processo de lavagem repetiu-se três vezes e após esta etapa colocou-se na estufa a 80°C para secagem do MIP, para no final ser efetuada uma nova moagem.

Para a síntese do NIP foi utilizada a mesma técnica com os mesmos procedimentos exceto a adição de Ac GLU.

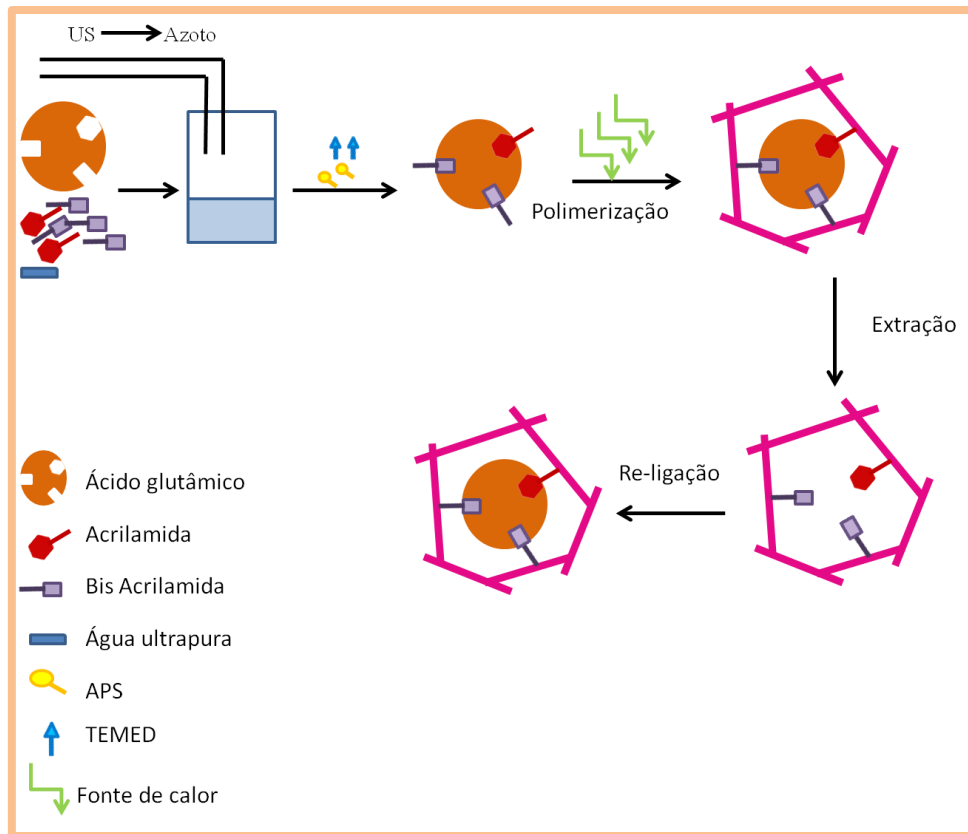


Figura 2. 4- Síntese da molécula impressa.

2.4 Preparação de membranas seletiva

Foram preparadas 6 membranas seletivas diferentes, nas quais incorporou-se em algumas delas alguns aditivos iônicos de forma a avaliar as suas respostas potenciométricas para uma dada solução. A suas composições e as suas respetivas massas encontram-se descritas na Tabela 2.3.

Tabela 2. 3- Membranas seletivas e respetivos constituintes.

Membranas	Sensor	Solvente mediador (oNFOE)	Plastificante (PVC)	THF	p-tetraoctophenol	Potassium tetrakis (4-chlorophenyl) borate
MIP	20mg	200mg	100mg	2,5mL	-	-
MIP p-top	20mg	200mg	100mg	2,5mL	10mg	-
MIP Tcpb	20mg	200mg	100mg	2,5mL	-	10mg
NIP	20mg	200mg	100mg	2,5mL	-	-
Ctr Tcpb	-	200mg	100mg	2,5mL	-	10mg
Ctr p-top	-	200mg	100mg	2,5mL	10mg	-

Mais tarde, após este estudo preparou-se novas membranas seletivas, com redução da quantidade de sensor inicial para 3%, 5%, 7% e 10% em relação ao solvente mediador. Alterou-se ainda a percentagem dos aditivos utilizados reduzindo em $10 \times$ a sua massa e o aditivo aniónico por um catiónico (Tabela 2.4).

Tabela 2. 4- Membranas seletivas e constituintes.

Sensor MIP MIP p-top MIP Tcpb	Massa (mg)	Solvente mediador (oNFOE)	Plastificante (PVC)	THF	Aditivos: (+) p-tetraoctophenol (+) p-tetraoctilammonium bromide
3%	6mg	200mg	100mg	2,5mL	1mg
5%	10mg				
7%	14mg				
10%	20mg				

Em ambos os casos, após as soluções das membranas estarem preparadas foram aplicadas na superfície do eletrodo construído. Após a sua colocação, deixou-se secar as membranas durante aproximadamente 24h. Depois das membranas estarem secas, estas foram hidratadas durante 24h, sendo imersas numa solução de água ultrapura e Ac GLU com a concentração de 1×10^{-6} .

2.5 Avaliação comparativa dos eletrodos.

A avaliação comparativa do desempenho dos eletrodos com as diferentes membranas foi efetuada através das curvas de calibração obtidas pela diferença de potencial gerada entre o eletrodo de referência e o eletrodo seletivo. Toda a medição da potenciometria foi realizada à temperatura ambiente e em agitação controlada e constante da solução. O valor da força eletromotriz de cada um dos eletrodos variou entre 0,2-0,3mV num valor constante de pH, demonstrando ser estável

As concentrações crescentes das soluções em análise começaram com uma quantidade inicial de 25mL de solução-tampão sendo adicionadas diferentes quantidades de solução-padrão ao longo da calibração. O objetivo deste estudo visa encontrar a gama de concentração detetável pelo sensor de forma a obter uma resposta linear que seja coincidente com o valor de referência encontrada na gama fisiológica da molécula alvo.

Para cada ensaio foram realizadas três calibrações para as mesmas condições em todos os ensaios e as suas curvas foram tratadas no Microsoft Excel Office 2010. Também foi avaliado o LRL, LOD, declive e R^2 em cada um dos ensaios, sendo escolhida para apresentação a curva de calibração com melhor resultado. Entre cada um dos ensaios, os eletrodos seletivos foram acondicionados em água ultrapura.

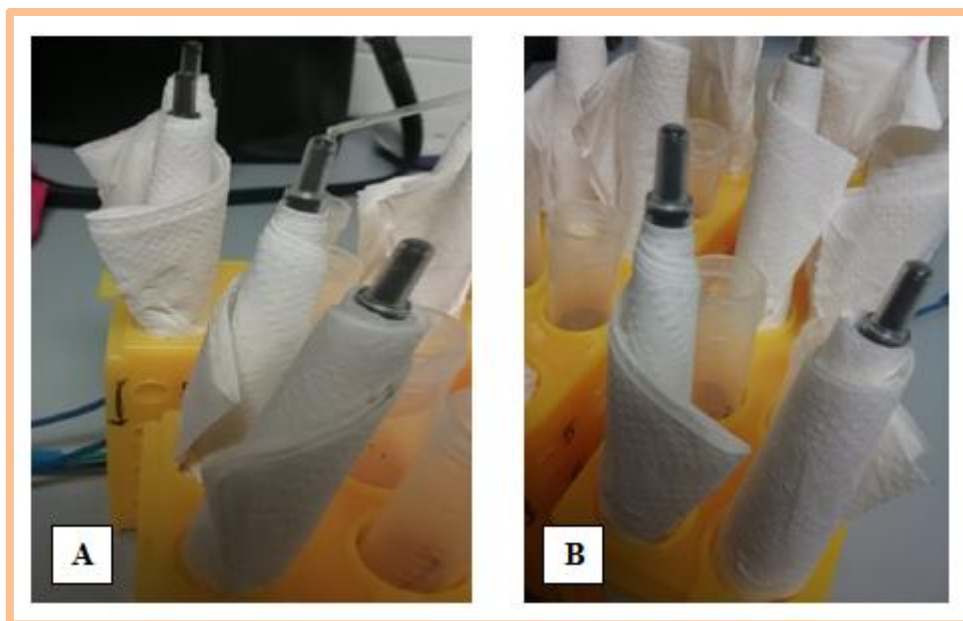


Figura 2. 5- Eléttodos seletivos ao ácidu glutâmico: A- Aplicaçãu da membrana; B- Vista lateral do eléttodo seletivo.

2.6 Avaliaçãu da seletividade

O cálculo dos valores de coeficiente de seletividade potenciométrica foi conseguido pelo método do *matched potential* com os interferentes de ureia, creatinina, glucose e ácidu ascórbico.

Neste método a concentraçãu do iãu principal foi mantida constante sendo adicionadas várius quantidade de iãu interferente, em que este é adicionado individual e separadamente na amostra de urina diluída em HEPES. Assim avaliou-se a resposta potenciométrica em cada adiçãu.

2.7 Análise da superfície

Inicialmente, registou-se a análise dos sensores MIP através da fotografia, antes e após a remoçãu bem como a do NIP, a fim de se verificar as diferenças visuais em termos de coloraçãu das partículas.

Os sensores MIP antes e após a remoçãu da molécula e o NIP foram sujeitos à análise microscópica, nomeadamente de SEM à temperatura ambiente, de baixo vácuo de modo a verificar se existe alguma diferença em termos morfológicos.

No EDS analisou-se o sensor MIP antes e após a molécula ser removida analisando também o NIP como controlo.

Os espetros de FTIR foram adquiridos nos sensores MIP antes e após a remoção do sensor e respetivo NIP com 250 varrimentos, resolução de 8 cm^{-1} com correção atmosférica.

Para a análise termogravítica TG pesou-se aproximadamente 10mg do MIP, antes e após a molécula ser removida, NIP e molécula. Os parâmetros utilizados durante a aquisição de espetros foram o azoto com um caudal de 100mL/min, com uma temperatura inicial de 30°C e final de 600°C , com uma taxa de aquecimento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

2.8 Análise de amostra

A análise das amostras foi realizada em urina e posterior avaliação em curvas de calibração. Substituindo a equação de regressão linear da calibração prévia, foi possível calcular-se as concentrações de Ac GLU.

3 Capítulo III- Resultados e discussão

Neste capítulo serão abordados os aspetos mais decisivos na preparação do sensor, assim como a análise dos diferentes sensores em SEM, EDS, FTIR e TG de forma a tentar perceber se existem diferenças entre eles. Será ainda discutido o comportamento dos sensores nos diferentes pHs e diferentes percentagens de sensor e aditivo. A interferência de alguns compostos foi também avaliada.

3.1 Características gerais de funcionamento dos sensores

3.1.1 Material biomimético

Para a construção do MIP optou-se pela polimerização em *bulk* pois trata-se de uma técnica de fácil execução, a molécula em estudo é de pequenas dimensões e em termos de disponibilidade não haviam restrições. O monómero escolhido para sintetizar o material biomimético foi a acrilamida com o agente reticulante a bis acrilamida pois este complexo forma uma matriz polimérica tendo como solvente a água. Este aspeto é importante pois o Ac GLU apresenta grande solubilidade neste solvente.

O material biomimético foi obtido com sucesso, permitindo que fosse possível a monitorização do ácido glutâmico através da potenciometria.

3.1.2 Membranas seletivas

Ao preparar diferentes membranas seletivas, com diferentes percentagens de sensores e aditivos iónicos, foi possível verificar qual a composição ideal para uma melhor resposta potenciométrica. As membranas seletivas foram preparadas com o material biomimético e NIP, dispersas em PVC e um solvente plastificante (oNFOE). Estes dois últimos componentes são bastante comuns na construção do ESI, não sendo necessária a sua otimização. Tendo em conta que o MIP é constituído por materiais poliméricos neutros, desempenhando assim um papel de ionóforo sem carga na membrana, adicionou-se um aditivo iónico para se obter uma melhor resposta potenciométrica. Inicialmente foram usados dois aditivos diferentes, um negativo, o potassium tetrakis (4-clotophenyl) borate (Tcpcb) e um positivo que favorece as ligações das pontes de hidrogénio, o p-tetraoctophenol (p-top), em membranas diferentes. Em paralelo foram introduzidas membranas sem sensor apenas com PVC, oNFOE e

respetivos aditivos iônicos utilizados. A adição de um aditivo diminuí a interferência de espécies que tenham a carga contrária ao mesmo tempo que diminui a resistência elétrica das membranas.

Um dos parâmetros que pode influenciar a medição da potenciometria é o pH., uma que este parâmetro pode influenciar a resposta da membrana seletiva assim como pode interferir na ionização do analito. Neste sentido, inicialmente, realizou-se ensaios com a finalidade de se verificar qual o pH com melhor resposta potenciométrica.

3.1.3 Efeito do pH

Os diferentes sensores foram avaliados em diferentes tampões, HEPES, MOPS e TRIS com pHs 5, 7 e 9, respetivamente. Os dados apresentados correspondem à melhor de 3 calibrações.

3.1.3.1 Tampão pH 5

Respetivamente à calibração em tampão HEPES, todos os elétrodos apresentaram bons declives variando entre 21,29 e 39,40 mV/década.

Todos os elétrodos apresentaram uma boa resposta potenciométrica e o ESI com controlo p-top (Ctr p-top) foi o que apresentou o declive melhor com 39,40 mV/década. Este ESI apresentou um comportamento linear a partir de $9,58 \times 10^{-6}$ mol/L sendo o seu limite de deteção de $2,77 \times 10^{-5}$ mol/L. No entanto, o ESI Ctr p-top trata-se apenas do aditivo p-top, o que possivelmente indica que a resposta obtida apenas provém do aditivo e não do sensor. Continuando a análise da tabela pode-se observar que o MIP p-top foi o eletrodo com segundo melhor resultado. Este ESI corresponde ao MIP com o mesmo aditivo que o apresenta o melhor declive (abordado anteriormente). Neste caso, o MIP com p-top (MIP p-top) apresenta um declive de 30,97mV/década e apresenta um comportamento linear a partir de $2,07 \times 10^{-5}$ mol/L. O limite de deteção é $1,29 \times 10^{-5}$ mol/L.

Tabela 3. 1- Melhores resultados dos ESIs em tampão HEPES.

HEPES	Declive (mV/década)	R ² (n=5)	LOD (mol/L)	LIRL (mol/L)
MIP	25,09±1,08	0,9951	9,69x10 ⁻⁶	9,58x10 ⁻⁶
MIP p-top	30,97±0,87	0,9908	1,29x10 ⁻⁵	2,07x10 ⁻⁵
MIP Tcpb	21,52±0,39	0,999	1,04x10 ⁻⁵	2,07x10 ⁻⁵
NIP	23,87±1,01	0,9985	1,31x10 ⁻⁵	2,07x10 ⁻⁵
Ctr Tcpb	21,29±0,85	0,9975	1,03x10 ⁻⁵	9,58x10 ⁻⁶
Ctr p-top	39,39±2,12	0,9861	2,77x10 ⁻⁵	9,58x10 ⁻⁶

Na Figura 3.1 pode-se encontrar as curvas de calibração correspondentes aos sensores MIP com e sem aditivos, NIP e aditivos. Ao analisarmos o gráfico presente na figura, pode-se verificar que os declives mais elevados foram obtidos pelo MIP que continha o aditivo p-top assim como o eletrodo que era composto apenas pelo mesmo aditivo. O Ctr p-top mais uma vez é o eletrodo com maior declive, confirmando o descrito anteriormente.

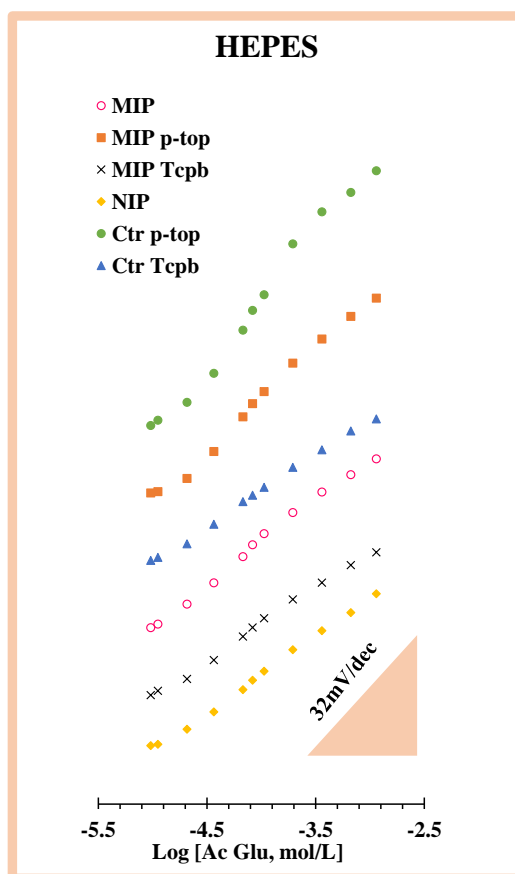


Figura 3. 1- Curvas de calibração do tampão HEPES.

3.1.3.2 Tampão pH 7

A calibração com tampão MOPS 1×10^{-3} mol/L com pH 7 todos os elétrodos apresentaram declives mais baixos comparando com os resultados obtidos anteriormente, como se pode verificar na Tabela 3.2. Apesar dos declives apresentados todos os elétrodos apresentaram uma boa resposta potenciométrica. Os melhores resultados foram obtidos pelo MIP com declive de 14,41 mV/década. Este apresenta um comportamento linear a partir de $3,61 \times 10^{-4}$ mol/L, sendo o seu limite de deteção de $1,81 \times 10^{-4}$ mol/L. Em termos gerais, os resultados obtidos neste pH não foram bons, pois os declives além de serem baixos apresentam uma estreita gama de linearidade.

Tabela 3. 2- Melhores resultados dos ESIs em tampão MOPS.

MOPS	Declive (mV/década)	R² (n=5)	LOD (mol/L)	LIRL (mol/L)
MIP	14,41±0,34	0,9943	$1,81 \times 10^{-4}$	$3,61 \times 10^{-4}$
MIP p-top	10,39±1,01	1	$3,51 \times 10^{-4}$	$6,64 \times 10^{-4}$
MIP Tcpb	14,05±0,67	0,9979	$1,87 \times 10^{-4}$	$3,61 \times 10^{-4}$
NIP	11,92±0,6	0,9998	$2,61 \times 10^{-4}$	$3,61 \times 10^{-4}$
Ctr Tcpb	14,17±0,54	0,9998	$1,43 \times 10^{-4}$	$3,61 \times 10^{-4}$
Ctr p-top	10,59±2,02	1	$3,28 \times 10^{-4}$	$6,64 \times 10^{-4}$

Na Figura 3.2 pode-se observar as curvas de calibração correspondentes aos sensores MIP com e sem aditivos, NIP e aditivos num pH neutro. Ao analisar o gráfico na Figura 3.2, pode-se observar que os declives são bastante baixos e a resposta linear é bastante tardia e com pouca gama de linearidade. Confirma-se que o MIP sem aditivos é o que obtém melhor resultado

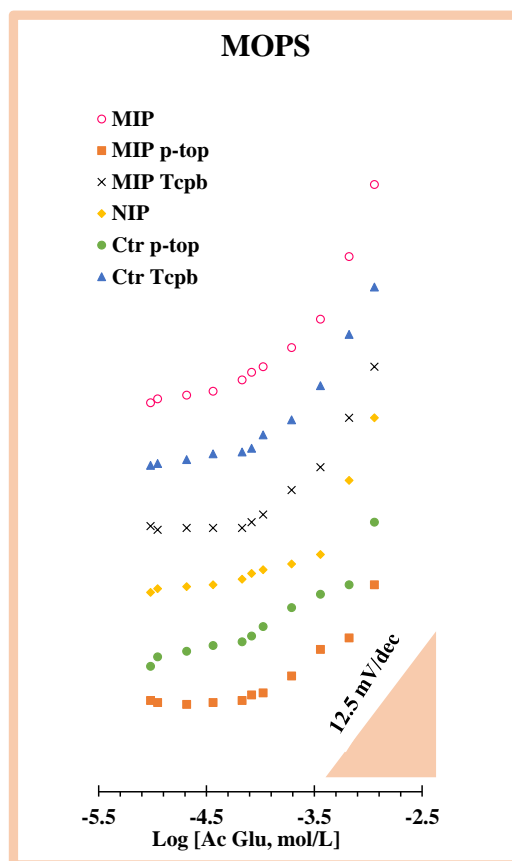


Figura 3. 2- Curvas de calibração do tampão MOPS.

3.1.3.3 Tampão pH 9 Tris

Nesta calibração com tampão TRIS 1×10^{-3} mol/L com pH 9 todos os elétrodos apresentaram resposta potenciométrica com declives superiores a 59mV/década, bastante acima do definido teoricamente. No entanto, os declives foram obtidos por apenas dois pontos.

Tabela 3. 3- Melhores resultados dos ESIs em tampão TRIS.

TRIS	Declive (mV/década)	R ² (n=5)	LOD (mol/L)	LIRL (mol/L)
MIP	234,55±14,26	1	5,07x10 ⁻⁴	6,64x10 ⁻⁴
MIP p-top	131,96±3,97	1	4,15x10 ⁻⁴	6,64x10 ⁻⁴
MIP Tcpb	171,98±6,39	1	4,72x10 ⁻⁴	6,64x10 ⁻⁴
NIP	120,47±14,89	1	3,34x10 ⁻⁴	6,64x10 ⁻⁴
Ctr Tcpb	391,63±102,87	1	3,53x10 ⁻³	6,64x10 ⁻⁴
Ctr p-top	362,6874±99,53	1	5,43x10 ⁻⁴	6,64x10 ⁻⁴

Na Figura 3.3 pode-se encontrar as curvas de calibração correspondentes aos sensores MIP com e sem aditivos, NIP e aditivos num pH 9 . Neste caso, pode-se verificar que os elétrodos têm um declive bastante baixo e tal como no tampão com pH 7, a linearidade inicia-se bastante tardiamente.

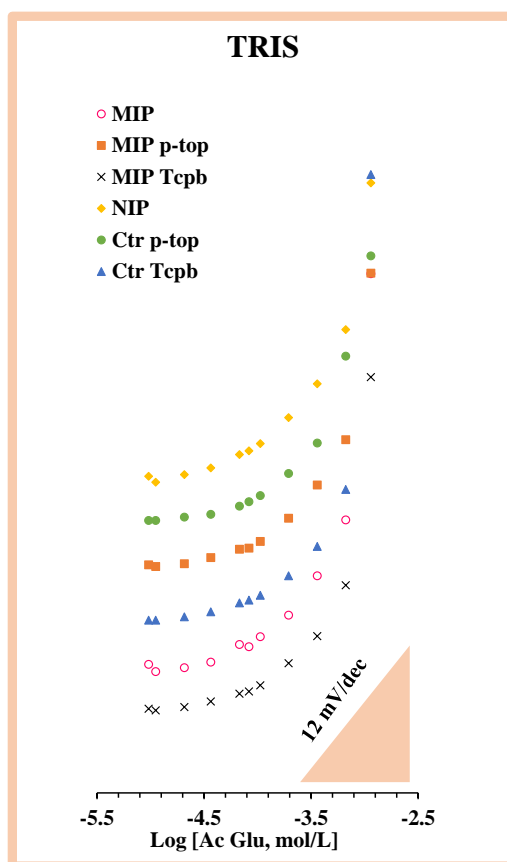


Figura 3. 3- Curvas de calibração do tampão TRIS.

3.1.3.4 Resumo do efeito do pH

Após a análise dos resultados que se obteve nos 3 tampões, pode-se afirmar que é no pH 5 que se apresentam os melhores. Tal pode ser verificado no gráfico da Figura 3.4 que corresponde ao MIP que se obteve melhores resultados nos 3 pHs. Este MIP corresponde ao que contém aditivo p-top (MIP p-top). Pode-se verificar que em HEPES o declive é superior, assim como apresenta uma resposta linear mais cedo e com uma maior gama linear. Por este motivo, procedeu-se à utilização deste tampão para se efetuar os estudos posteriores.

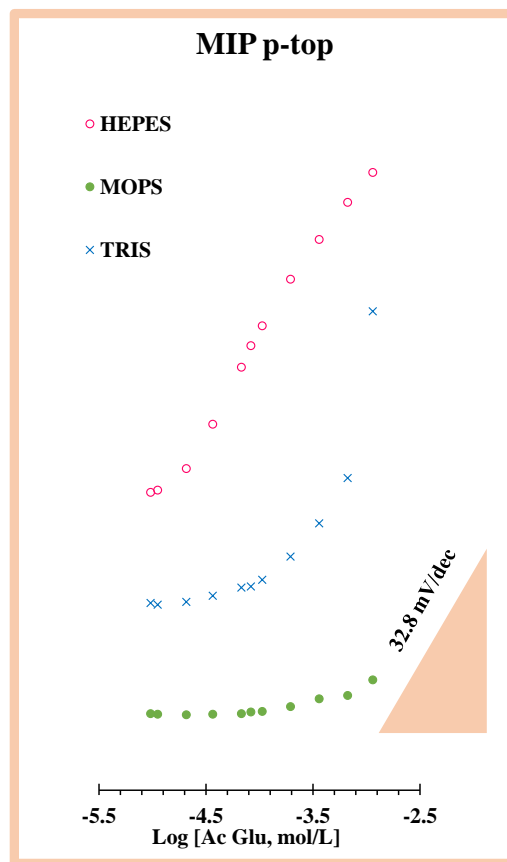


Figura 3. 4- Curvas de calibração dos três tampões.

Contudo recorreu-se ao estudo de diferentes percentagens de sensor e diminuição de aditivo, de forma a evitar que a resposta obtida anteriormente se deve ao aditivo ou ao excesso de sensor presente na membrana. Assim, prosseguiu-se à diminuição a percentagem de sensor para 3%, 5%, 7% e mantendo-se 10% do inicial de forma a determinar se havia melhorias no comportamento dos eléctrodos. Ao mesmo tempo reduziu-se o aditivo para 10% do inicial. Trocou-se ainda um dos aditivos, o potassium tetrakis borate (Tcpb) (negativo) por outro positivo, pois através dos resultados

anteriormente obtidos pareceu que a molécula estava carregada negativamente e por este motivo ao introduzir este composto poderia-se obter melhores resultados.

Como inicialmente os elétrodos após as calibrações eram guardados emergidos em água no frigorífico, procedeu-se a um pequeno estudo paralelo, com o intuito de se verificar se havia alteração em termos de resposta potencimétrica no decorrer do tempo.

3.1.4 Efeito da temperatura

Neste pequeno estudo, utilizou-se o elétrodo MIP p-top com as diferentes percentagens de sensor (3%, 5%, 7% e 10%) e redução do aditivo para 10%, testados em HEPES. A Figura 3.5 corresponde aos resultados obtidos:

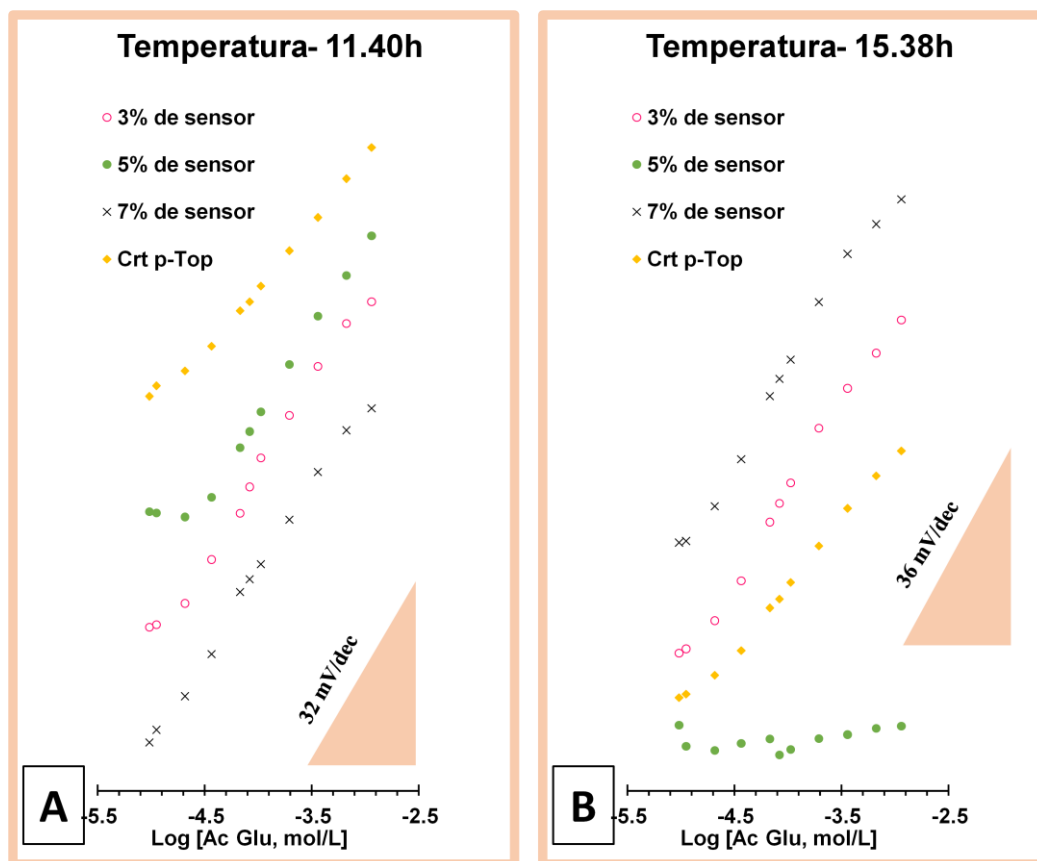


Figura 3. 5- Curvas de calibração ao longo do tempo. A- Resposta potencimétrica às 11:40h; B- Resposta potencimétrica às 15:38h.

Na primeira imagem, da Figura 3.5A, pode-se observar um declive global de 32mV/década. A segunda imagem, da Figura 3.5B, a leitura potencimétrica foi efetuada cerca de 3 horas depois da primeira. Contudo ocorreu um aumento do declive para 36 mV/década apesar do elétrodo 5% apresentar um comportamento não linear,

podendo estar relacionado com as sucessivas calibrações anteriormente realizadas. Após os resultados obtidos foi determinado que os elétrodos seriam mantidos à temperatura ambiente.

3.1.5 Percentagem de sensor na membrana seletiva e aditivos.

Após a verificação do pH mais adequado a ser utilizado, no caso o HEPES, para a detecção do AC GLU, efetuou-se o estudo das diferentes percentagens de sensor. Assim reduziu-se o sensor para 3%, 5%, 7% e 10% . No caso do aditivo, este foi reduzido para 10% e com troca do aditivo negativo pelo positivo. Como o objetivo será aumentar a resposta potenciométrica e conseqüentemente a sensibilidade seletividade do biossensor, optou-se apenas por realizar este estudo apenas nos diferentes MIPs.

3.1.5.1 Percentagem:3%

Como se pode verificar na tabela, o MIP com o aditivo positivo apresenta declive negativo, no entanto a sua inclinação é a mais baixa comparativamente com os outros dois MIPs. O melhor resultado foi obtido pelo MIP p-top cujo declive corresponde a 29,33 mV/década. O MIP p-top apresenta um comportamento linear a partir de $9,58 \times 10^{-6}$ mol/L coincidindo com o limite de detecção.

Tabela 3. 4- Melhores resultados com 3% de sensor em HEPES.

HEPES	Declive (mV/década)	R ² (n=5)	LOD (mol/L)	LIRL (mol/L)
MIP	18,09±1,38	0,9942	$1,22 \times 10^{-5}$	$1,12 \times 10^{-5}$
MIP p-top	29,33±4,86	0,9978	$9,58 \times 10^{-6}$	$9,58 \times 10^{-6}$
MIPpositivo	-14,01±0,4	0,9921	$9,83 \times 10^{-6}$	$9,58 \times 10^{-6}$

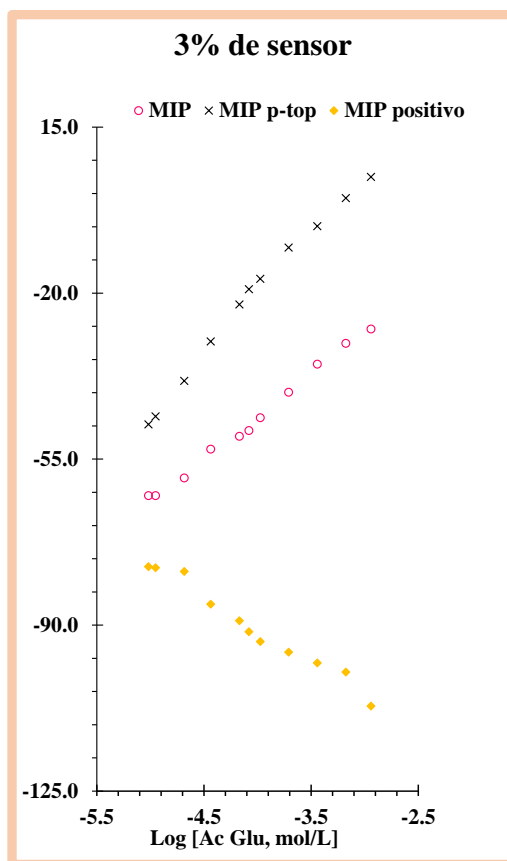


Figura 3. 6- Curvas de calibração de 3% em HEPES.

Analisando a Figura 3.6, é possível observar que de facto nos elétrodos com 3% de sensor, o MIP positivo tem um declive negativo. Os restantes elétrodos apresentam declive positivo. É importante salientar que o declive de MIP p-top tem uma maior inclinação que o MIP sem qualquer aditivo, sendo portanto este o melhor resultado.

3.1.5.2 Percentagem:5%

Mais uma vez, o elétrodo MIPpositivo apresentou um declive negativo, ainda que baixo comparativamente com os outros dois. O elétrodo com melhor resultado foi o MIP p-top cujo declive foi de 39,60mV/década, tendo como limite de deteção $9,37 \times 10^{-6}$ mol/L, sendo que o seu comportamento linear inicia em $9,58 \times 10^{-6}$ mol/L.

Tabela 3. 5- Melhores resultados com 5% de sensor em HEPES.

HEPES	Declive (mV/década)	R ² (n=5)	LOD (mol/L)	LIRL (mol/L)
MIP	25,17±0,32	0.9939	1,26x10 ⁻⁵	1,12x10 ⁻⁵
MIP p-top	39,60±8,65	0.9914	9,37x10 ⁻⁶	9,58x10 ⁻⁶
MIPpositivo	-11,84±0,72	0.9854	6,53x10 ⁻⁶	1,12x10 ⁻⁵

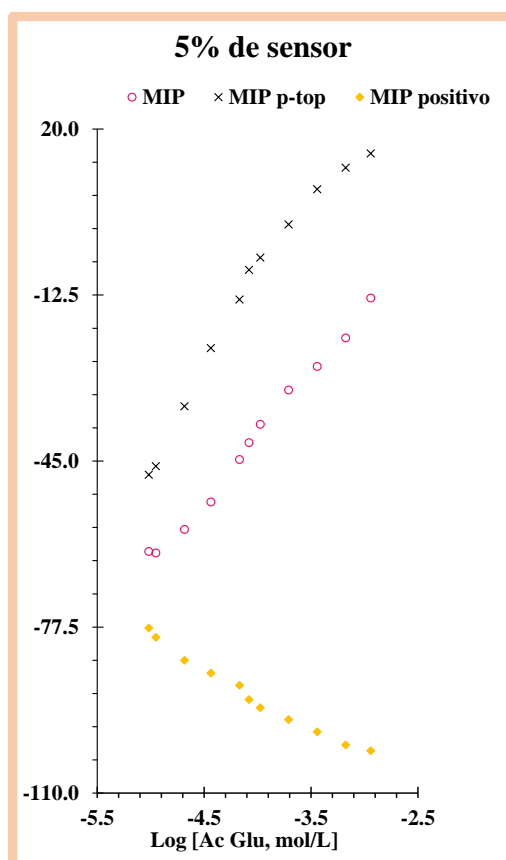


Figura 3. 7- Curvas de calibração de 5% em HEPES.

A Figura 3.7 permite comprovar que um dos elétrodos com 5% de sensor tem declive negativo. O MIP sem qualquer aditivo e o MIPp-top apresentam declive positivo. O melhor resultado foi obtido pelo MIPp-top sendo visível que o seu declive é maior.

3.1.5.3 Percentagem:7%

Entre os três sensores testados, o MIP positivo tem uma resposta potenciométrica negativa comparativamente com os restantes dois. No entanto, o MIP p-top é o que apresenta melhor resultado, ainda que bastante próximo do MIP sem qualquer aditivo.

Neste caso, o MIP p-top apresenta um declive de 22,47mV/década. O seu limite de deteção surge nos $9,32 \times 10^{-6} \text{M}$, bastante próximo da linearidade apresentando em $9,58 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$.

Tabela 3. 6- Melhores resultados com 7% de sensor em HEPES.

HEPES	Declive (mV/década)	R ² (n=5)	LOD (mol/L)	LIRL (mol/L)
MIP	22,43±0,03	0,9955	$2,46 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-5}$
MIP p-top	22,47±1,58	0,9992	$9,32 \times 10^{-6}$	$9,58 \times 10^{-6}$
MIPpositivo	-10,45±1,6	0,9959	$6,58 \times 10^{-6}$	$1,12 \times 10^{-5}$

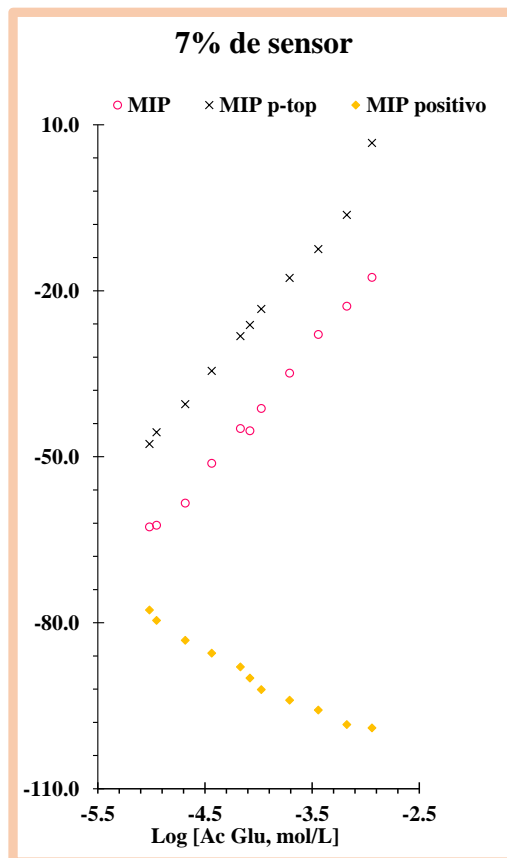


Figura 3. 8- Curvas de calibração de 7% de sensor em HEPES.

A Figura 3.8 trata-se da representação gráfica das 3 curvas de calibração dos eléctrodos com 7% de sensor presente. Visualmente, o MIPpositivo mantém o seu comportamento semelhante ao das restantes percentagens anteriores, tendo também o

seu declive negativo. Por outro lado, o MIP e o MIP p-top apresentam ambos o declive positivo. O melhor resultado trata-se do MIP p-top.

3.1.5.4 Percentagem:10%

No caso do eléctrodo MIP positivo o mesmo comportamento de declive negativo repete-se como nas outras percentagens de sensor. O MIPp-top foi o eléctrodo que obteve melhores resultados, tendo 34,70mV/decada de declive. O limite de detecção foi de $8,90 \times 10^{-6}$ mol/L com uma resposta linear que se inicia-se a $9,58 \times 10^{-6}$ mol/L.

Tabela 3. 7- Melhores resultados com 10% de sensor em HEPES.

HEPES	Declive (mV/década)	R ² (n=5)	LOD (mol/L)	LIRL (mol/L)
MIP	26,42±2,45	0,9979	$1,75 \times 10^{-5}$	$2,07 \times 10^{-5}$
MIP p-top	34,70±2,16	0,9932	$8,90 \times 10^{-6}$	$9,58 \times 10^{-6}$
MIPpositivo	-9,30±0,4	0,9938	$2,04 \times 10^{-6}$	$1,12 \times 10^{-5}$

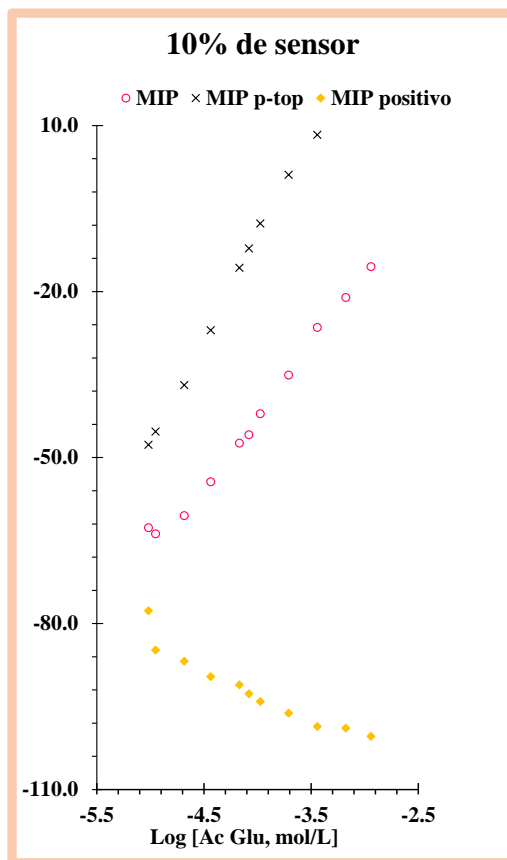


Figura 3. 9- Curvas de calibração de 10% de sensor em HEPES.

Na Figura 3.9, com os elétrodos de 10% de sensor, pode-se observar dois ESIs com o mesmo comportando e o restante com comportamento oposto: O MIP_{positivo} surge com declive negativo novamente e o MIP e o MIP_{p-top} apresentam declive positivo. O melhor declive é consistente com os resultados anteriores, sendo o MIP_{p-top} o melhor.

3.1.5.5 Resumo da percentagem de sensor na membrana seletiva e aditivos

Como se pode verificar anteriormente, o MIP_{p-top} foi a membrana seletiva que melhores resultados obteve, sendo este facto sustentado pelas curvas de calibração bem como resultados já apresentados e discutidos anteriormente.

Assim foram efetuadas novas calibrações apenas com esta membrana a fim de se perceber qual a percentagem de sensor com melhor resposta potenciométrica. A tabela 3.8 apresenta o melhor resultado para cada uma das percentagens de sensor. Assim, melhor resultado corresponde ao ESI com 3% sensor que apresenta 27,79mV/década. O seu limite de deteção corresponde a $1,09 \times 10^{-5}$ mol/L e o seu comportamento linear manifesta-se a $9,58 \times 10^{-6}$ mol/L.

Tabela 3. 8- Melhores resultados de todas as percentagens do sensor p-top.

MIP _{p-top}	Declive (mV/década)	R ² (n=5)	LOD (mol/L)	LIRL (mol/L)
3%	27,79±1,4	0,9904	$1,09 \times 10^{-5}$	$9,58 \times 10^{-6}$
5%	24,96±0,8	0,9905	$1,97 \times 10^{-5}$	$9,58 \times 10^{-6}$
7%	18,32±1,7	0,9935	$9,78 \times 10^{-6}$	$9,58 \times 10^{-6}$
10%	24,49±0,9	0,9956	$9,92 \times 10^{-6}$	$9,58 \times 10^{-6}$
Ctr p-top	23,12±0,67	0,9933	$1,03 \times 10^{-5}$	$9,58 \times 10^{-6}$

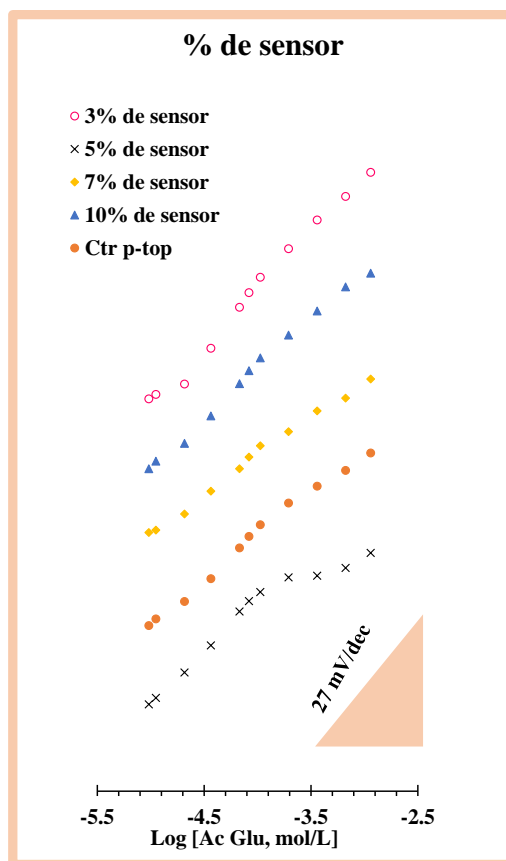


Figura 3. 10- Curvas de calibração das diferentes percentagens com o sensor p-top.

Observando a Figura 3.10 pode-se de facto comprovar que o MIP p-top com 3% de sensor é o que apresenta melhor resultado face às outras percentagens em estudo.

Em suma, os melhores resultados foram obtidos para a membrana seletiva do MIPp-top com 3% de sensor. Posto isto, analisou-se a linearidade da resposta potenciométrica com as condições tidas como ideais. A Tabela 3.9 representa o melhor resultado de cada um dos sensores. O melhor resultado obtido apresenta um declive de 21,31mV/década. O limite de deteção é $5,83 \times 10^{-6}$ mol/L enquanto que a linearidade inicia-se a $8,78 \times 10^{-6}$ mol/L.

Tabela 3. 9- Melhor resultado do sensor Mip p-top com 3% de sensor.

MIP p-top	Declive (mV/década)	R ² (n=5)	LOD (mol/L)	LIRL (mol/L)
3%	21,31±0,79	0,9971	$5,83 \times 10^{-6}$	$8,78 \times 10^{-6}$
NIP	16,88±0,69	0,9973	$3,51 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-6}$
Ctr	19,96±3,01	0,9950	$4,64 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-6}$

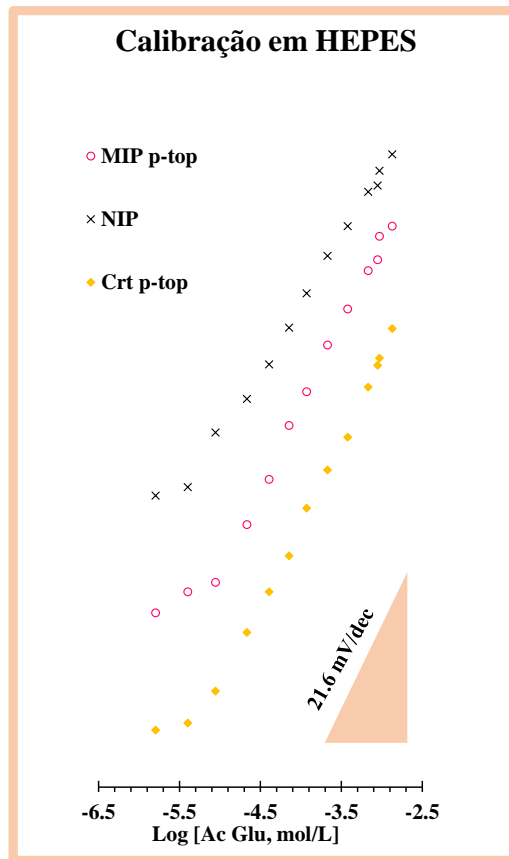


Figura 3. 11- Curvas de calibração com MIP p-top 3% em HEPES.

Analisando a Figura 3.11 pode-se observar que de facto o sensor que contém 3% deste com o aditivo p-top tem boa resposta potenciométrica associada a boa linearidade. Neste estudo, a calibração foi efetuada com o NIP, o MIPp-top com 3% de sensor e o respetivo controlo, de forma a garantir que resposta era de facto do material biomimético, o que se veio a verificar.

3.1.6 Tempo de resposta, tempo de vida e estabilidade.

O tempo de resposta é considerado o necessário para que o potencial se mantivesse constante. Neste caso considerou-se o valor de 0,3 mV. Os elétrodos utilizados no presente estudo apresentam-se com boa estabilidade. As soluções de Ac GLU apresentavam a concentração de 4×10^{-3} mol/L sendo que a estabilização da resposta potenciométrica ocorre em cerca de 30s, mesmo em concentrações superiores. Inicialmente, o valor do potencial sem adição da molécula demorou cerca de 10-15min a estabilizar mas nunca um intervalo de tempo superior.

Observou-se que entre calibrações, os elétrodos tinham uma boa recuperação. Em calibrações em dias consecutivos observou-se que os elétrodos apresentavam estabilidade a longo prazo e pouca variação do potencial.

3.2 Análise fotografica dos sensores.

As figuras seguintes correspondem às fotografias tiradas aos sensores NIP (Figura 3.12A) e MIP antes e após a remoção da molécula, como na Figura 3.12B e 3.12C respetivamente.

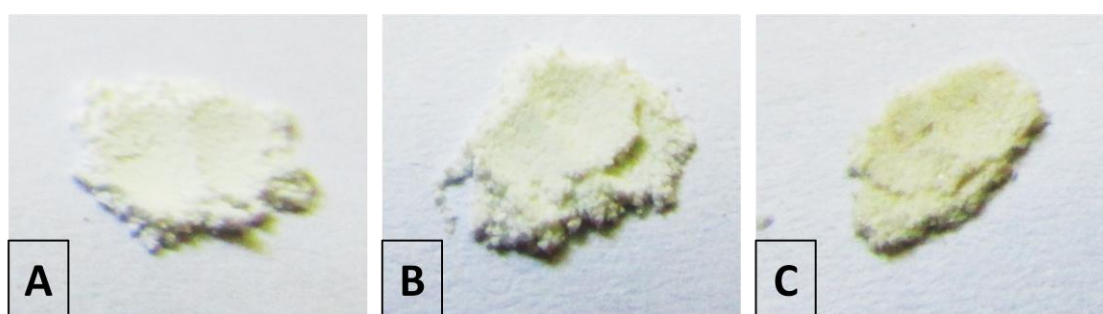


Figura 3. 12- Fotografias do sensores: A-NIP; B-MIP após remoção do Ac GLU; C-MIP com Ac GLU.

Observando a Figura 3.12 pode-se dizer que em termos de coloração esta é ligeiramente diferente entre cada um dos MIPs e o próprio NIP. O NIP surge com uma cor branca, enquanto que o MIP com Ac GLU apresenta uma cor mais acinzentada. Após a remoção da molécula, verifica-se que o MIP tem uma tonalidade mais clara comparativamente com o anterior. Esta diferença pode indicar que o Ac GLU está presente na matriz polimérica, pois após a sua remoção o polímero tende a adquirir uma tonalidade mais próxima do NIP.

3.3 Análise da superfície dos materiais dos sensores

3.3.1 Análise SEM

As imagens seguintes correspondem à análise SEM no qual se procedeu à análise do MIP antes e após a remoção da molécula e o NIP:

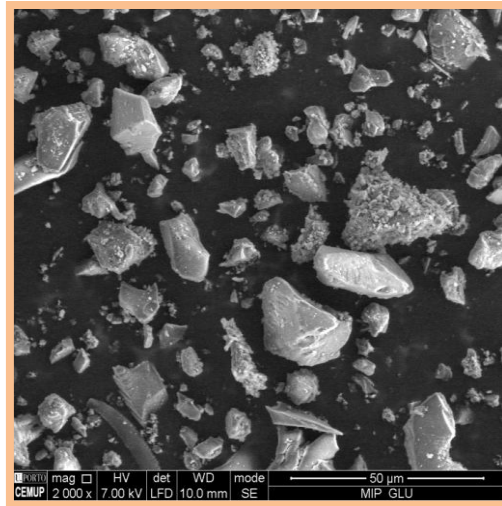


Figura 3. 13- Imagem SEM do MIP antes da remoção.

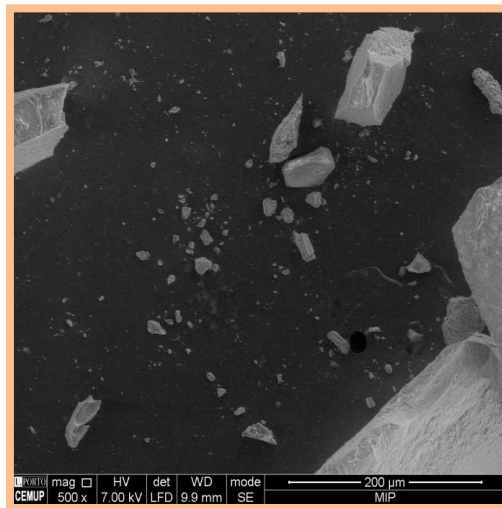


Figura 3. 14- Imagem SEM do MIP após a remoção.

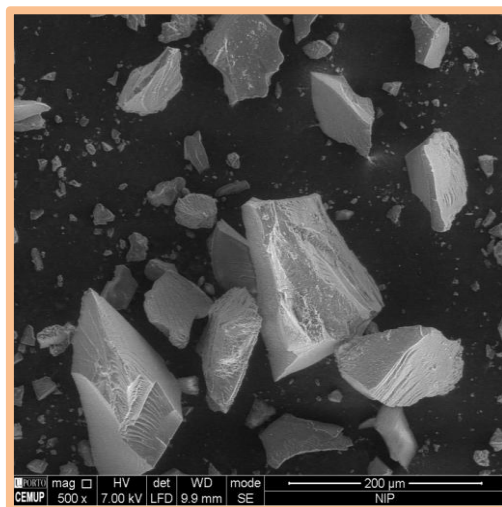


Figura 3. 15- Imagem SEM do NIP.

Observando os resultados da análise, constata-se que em termos morfológicos os três apresentam sensivelmente a mesma morfologia, não sendo perceptível diferenças entre os dois MIP e o NIP. Este facto pode dever-se ao tamanho reduzido da molécula e possivelmente não se detetaria melhorias caso se focasse com maior ampliação. Em suma, a análise SEM foi inconclusiva em termos morfológicos, todavia na análise EDS que será abordada seguidamente, pode-se constatar diferenças significativas entre os três sensores.

3.3.2 Análise EDS

O gráfico seguinte (Figura 3.16) representa a análise EDS do MIP antes e após a remoção e do NIP:

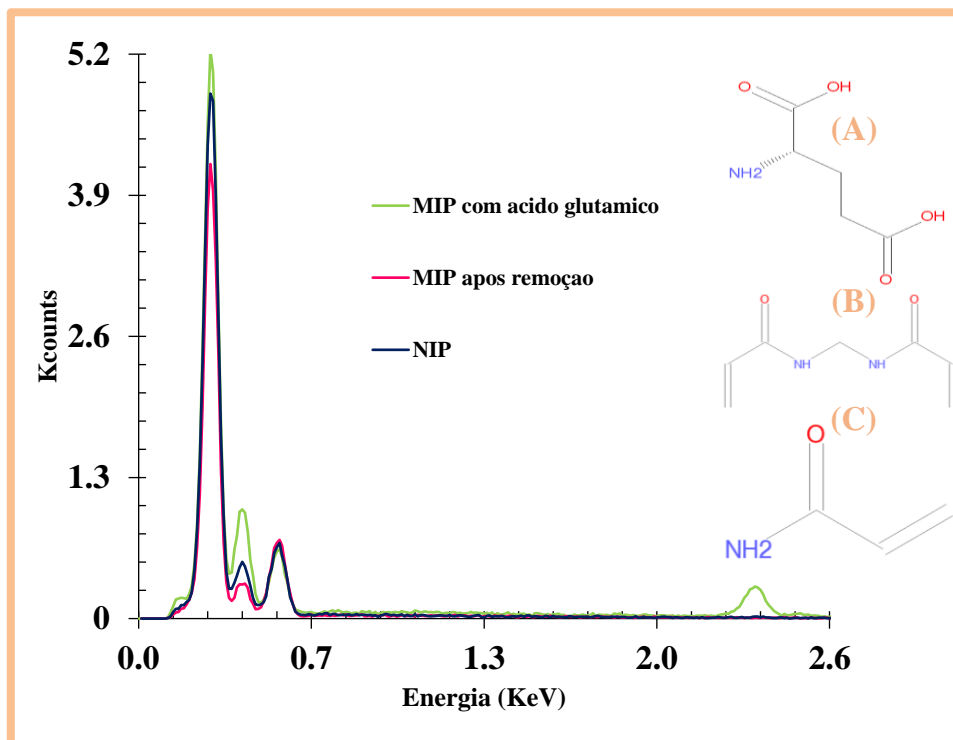


Figura 3. 16- Análise EDS do MIP com ácido glutâmico, MIP após a remoção e NIP.

- A- Ácido glutâmico
- B- Bis acrilamida
- C- Acrilamida

Analisando o gráfico pode-se verificar que o MIP com Ac GLU (ou seja, antes da remoção) possui uma banda com maior intensidade correspondente ao azoto quando

comparado com o MIP após a remoção da molécula. Isto pode dever-se ao facto deste material conter Ac GLU, bis acrilamida e acrilamida pois estes apresentam na sua estrutura química aminas e amidas, respetivamente. Por isso este elemento químico está presente em maior quantidade no MIP com Ac GLU quando comparado com os outros sensores. Ao ser removido o ácido glutâmico do MIP, é espectável que a quantidade de azoto presente seja menor, pois deixa de haver contribuição do grupo de aminas provenientes do Ac GLU. Este facto é confirmado através da Figura 3.16, no qual o MIP após a remoção apresenta uma diminuição do teor deste mesmo elemento. Comparando o NIP e o MIP após a remoção, o NIP apresenta maior teor de azoto do que o MIP, possivelmente por este ultimo apresentar cavidades provenientes da remoção do Ac GLU, apresentando assim uma superfície mais rugosa.

3.3.3 Análise FTIR

Foram traçados espectros de FTIR para os materiais sensores MIP com Ac GLU, NIP, Ac GLU e MIP após remoção. As imagens relativas a esse espectro estão apresentadas na Figura 3.17. As Figuras 3.18 e 3.19 tratam-se de uma ampliação do espectro em regiões de interesse de forma a ser mais perceptível a análise.

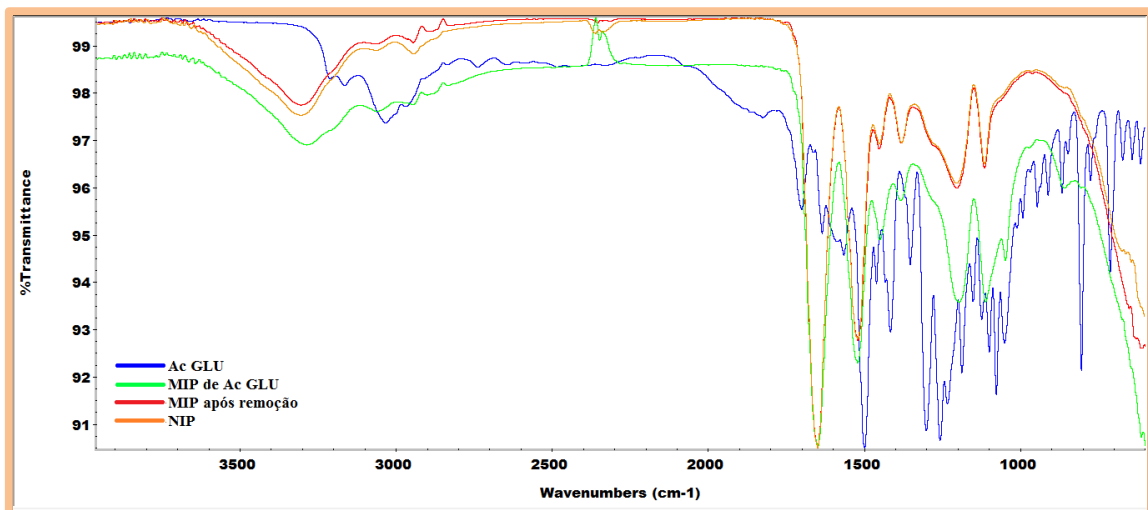


Figura 3. 17- Espectro FTIR dos sensores de 3500cm-1 a 600cm-1

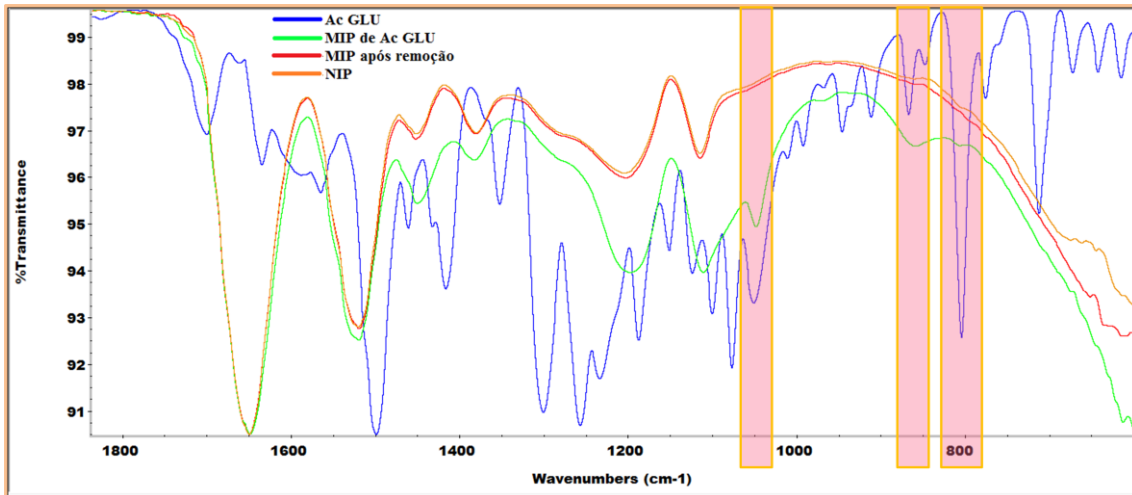


Figura 3. 18- Espectro FTIR dos sensores na gama 1800-600 cm^{-1} .

Na Figura 3.18 que apresenta comprimentos de onda compreendidos em 1800 a 600 cm^{-1} pode-se constatar que o MIP com Ac GLU apresenta um espectro com algumas semelhanças quando comparado com o Ac GLU, observando-se três picos com comprimentos de onda semelhantes. O primeiro pico aparece a $804,28\text{cm}^{-1}$ no Ac GLU e a $806,18\text{cm}^{-1}$ no MIP com Ac GLU possivelmente associados a amins N-H proveniente do Ac GLU. Pode-se ainda constatar um pico no MIP com Ac GLU a $859,37\text{cm}^{-1}$ correspondente ao ácido carboxílico COOH mais uma vez podendo ser procedente do Ac GLU que apresenta um deslocamento de pico em relação ao anterior ($866,64\text{cm}^{-1}$). O último pico neste comprimento de onda surge a $1050,91\text{cm}^{-1}$ no Ac GLU e a $1047,95\text{cm}^{-1}$ no MIP com Ac GLU que corresponde a uma vibração do grupo alcano (étil) CH_2CH_3 , podendo estar associado ao Ac GLU.

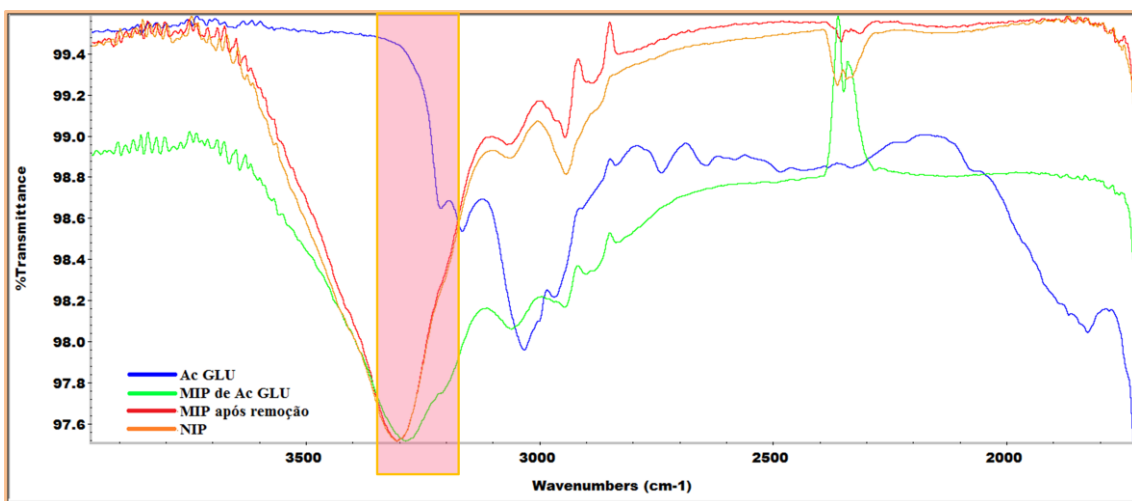


Figura 3. 19- Espectro FTIR dos sensores na gama 4000-1700 cm^{-1} .

Na Figura 3.19 com gama de comprimento de onda que compreende os 1700 cm^{-1} e os 4000 cm^{-1} pode-se observar ainda evidências da presença do Ac GLU no MIP com Ac GLU, pois este último apresenta um pico embora pouco definido a $3211,27\text{ cm}^{-1}$ que coincide com o pico do Ac GLU localizado a $3212,38\text{ cm}^{-1}$ que corresponde novamente aos ácidos carboxílicos COOH. Quanto ao MIP com Ac GLU e o MIP após a remoção estes apresentam algumas semelhanças nomeadamente por volta dos 3300 cm^{-1} , notando-se um deslocamento entre os comprimentos de onda, apresentando o pico a 3286 cm^{-1} para MIP com Ac GLU e a 3306 cm^{-1} no MIP após a remoção, podendo este deslocamento estar associado a uma possível contribuição da amina do Ac GLU. Neste comprimento de onda também se encontra um pico de NIP a 3305 cm^{-1} do NIP, que pode corresponder às amidas C=NH₂ do próprio polímero.

De um modo geral pode se concluir que o Ac GLU fica aprisionado na matriz polimérica após a síntese do MIP e é praticamente removido após a sua remoção em 10% de ácido acético.

3.4 Análise termogravítica (TG) dos sensores

3.4.1 Análise TG

A análise TG tem por base as diferenças entre a estabilidade térmica dos diferentes compostos durante o aquecimento. A curva da perda de massa (TG) e as suas primeiras derivadas (DTA e DTG) monitorizam os diferentes processos e etapas que ocorrem nos materiais durante a degradação de cada um deles. A análise TG estuda a decomposição dos diferentes compostos conforme o aumento da temperatura. O DTA permite concluir através dos picos se se está perante uma reação endotérmica (DTA negativo) ou exotérmica (DTA positivo), facto que é reforçado pelo DTG que apenas nos remete que aconteceu alguma alteração em termos reacionais.

A Figura 3.20 representa a análise termogravítica dos sensores MIP com Ac GLU, MIP após a remoção e o Ac GLU.

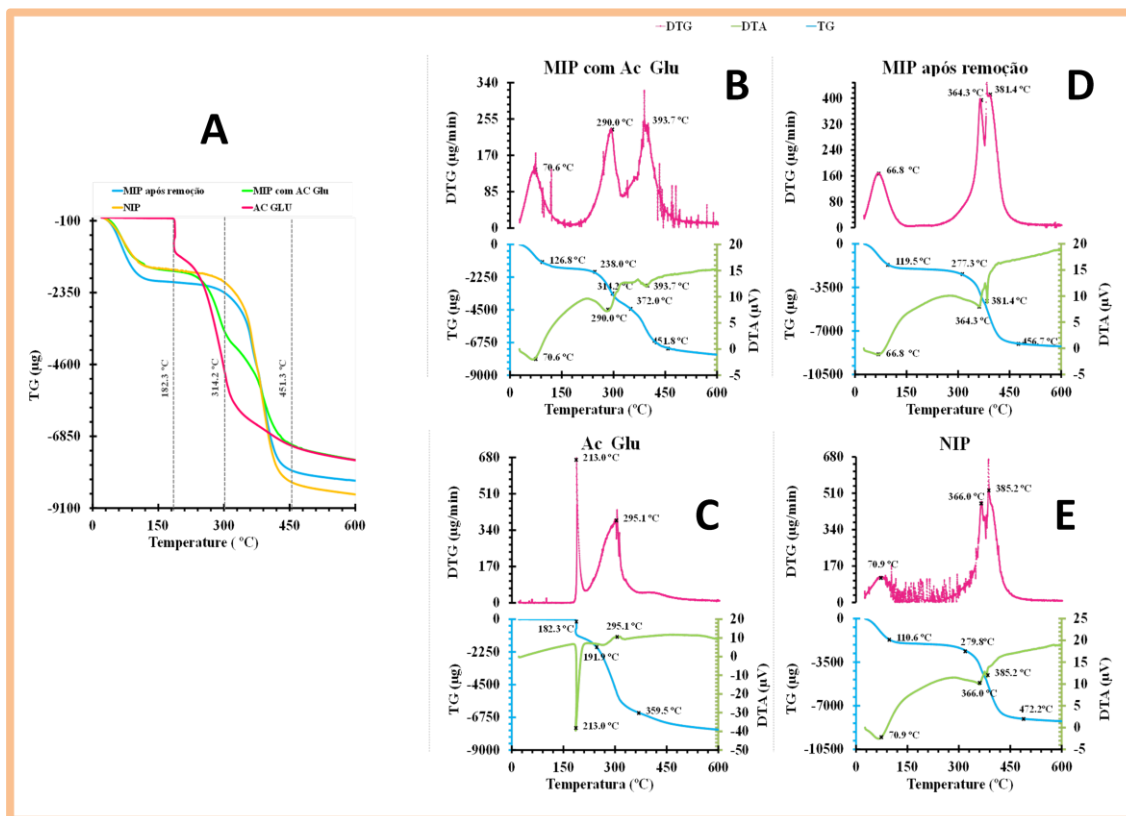


Figura 3. 20- Análise termogravítica dos diferentes sensores e molécula.

De acordo com a imagem B da Figura 3.20 pode-se afirmar que a primeira perda de massa do MIP com Ac GLU é quase nula, 0,5%, que segundo o DTA provocou uma reação endotérmica ou seja, o composto absorveu o calor a que estava a ser submetido. Após esta perda de massa quase insignificante, ocorrem dois estágios de perda de massa consecutivos: O primeiro estágio dá-se desde os 126,8°C até aos 314,2°C provocando uma perda de 17,4% de massa ao mesmo tempo que ocorre uma reação exotérmica provocando libertação de calor; o segundo estágio dá-se desde os 314,2°C até atingir os 451,8°C, neste caso há perda de massa de 4,13% ocorrendo de igual forma uma reação exotérmica. No final da reação foi degradada 72,04% de massa total.

Analisando a imagem C da Figura 3.20 verifica-se uma pequena perda de massa do Ac GLU que ocorre até 182,3°C, sendo a percentagem de 0,29%. Apesar da pouca perda de massa, o DTA sugere que se deu uma forte reação endotérmica que provocou a absorção de calor por parte da molécula. Após esta perda de massa, até 191,9°C deu-se uma perda de massa de forma abrupta degradando 11,16%. Ao contrário da perda anterior, esta surge associada a uma reação exotérmica, de acordo com o DTA. Seguiu-se a maior perda de massa verificada no caso do Ac GLU, dos 191,9°C até aos 359,5°C,

havendo perda na ordem dos 52,57%. A reação provocada pela perda tratou-se de uma reação exotérmica. No final da reação, aos 599,2°C a perda total de massa foi de 76,68%.

A imagem D da Figura 3.20 sugere que o MIP após a remoção tem uma perda inicial de massa de 19,23%, no entanto apresentou uma reação endotérmica, constatada no DTA correspondente. No intervalo 119,5°C aos 277,08°C, a perda de massa é de 2,85% e durante este ocorre uma nova reação, mas exotérmica. A maior perda de massa é obtida desde os 277,08°C até aos 456,7°C, sendo neste caso de 57,69% ocorrendo durante este intervalo uma reação exotérmica, ou seja, houve libertação de energia sob forma de calor. A perda final de massa corresponde a 82,87%.

Observando a imagem E pode-se afirmar que o comportamento termogravítico do NIP é bastante similar ao MIP após a remoção, tendo temperatura de degradação, perdas de massa e picos de DTA e DTG bastante próximos, o que de facto tem fundamento pois o MIP com a molécula removida da matriz polimérica, quimicamente é idêntico ao NIP. Assim, pode-se constatar que ocorre a primeira perda de 13,56% até aos 110,6°C, durante o qual se deu uma reação endotérmica. Após esta perda, uma pequena perda de massa de 3,82% surgiu, em simultâneo com uma reação exotérmica no intervalo 110,6-279,8°C. Seguiu-se a maior perda de massa de todo o processo, 60,92%, desde os 279,8°C até alcançar os 472,2°C, repetindo-se a reação exotérmica. A perda final de massa corresponde a 82,87%.

Analisando a imagem A constata-se que o MIP com Ac GLU tem duas perdas de massa consecutivas sendo a primeira coincidente com a perda de massa significativa do Ac GLU ainda que menor, sugerindo que a molécula se encontra presente no sensor. De forma a comprovar que a molécula foi removida do polímero, observa-se que a termogravimetria NIP e do MIP após a remoção é bastante semelhante, o que de facto se deve verificar já que quimicamente são idênticos, traduzindo-se em perdas de massa a temperaturas bastantes coincidentes.

3.5 Seletividade do sensor

A seletividade de um sensor torna-o seletivo para determinado ião, no entanto não o torna específico apenas para ele, podendo ocorrer a deteção de iões que não interessam, estando apenas a interferir no estudo. Assim, determinou-se a resposta potenciométrica

do Ac GLU numa amostra biológica, mais concretamente na urina (diluída em HEPES 100 vezes). A gama de concentração variou desde $1,6 \times 10^{-6}$ a $1,48 \times 10^{-3}$, recorrendo às melhores condições (MIPp-top com 3% de sensor).

A Tabela 3.10 corresponde à calibração com o eletrodo MIPp-top com 3% de sensor.

Tabela 3. 10- Resultados da calibração com urina.

MIP p-top	Declive (mV/década)	R ² (n=5)	LOD (mol/L)	LIRL (mol/L)
3%	18,32	0,9914	$4,61 \times 10^{-5}$	$7,15 \times 10^{-5}$
NIP	15,69	0,9967	$4,1 \times 10^{-5}$	$7,15 \times 10^{-5}$
Ctr	17,89	0,9938	$4,2 \times 10^{-5}$	$7,15 \times 10^{-5}$

Analisando a Tabela 3.10 pode-se constatar que o sensor obteve um declive de 18,32mV/década. A resposta potenciométrica atingiu a linearidade a $7,15 \times 10^{-5}$ mol/L e o limite de deteção é de $4,61 \times 10^{-5}$ mol/L.

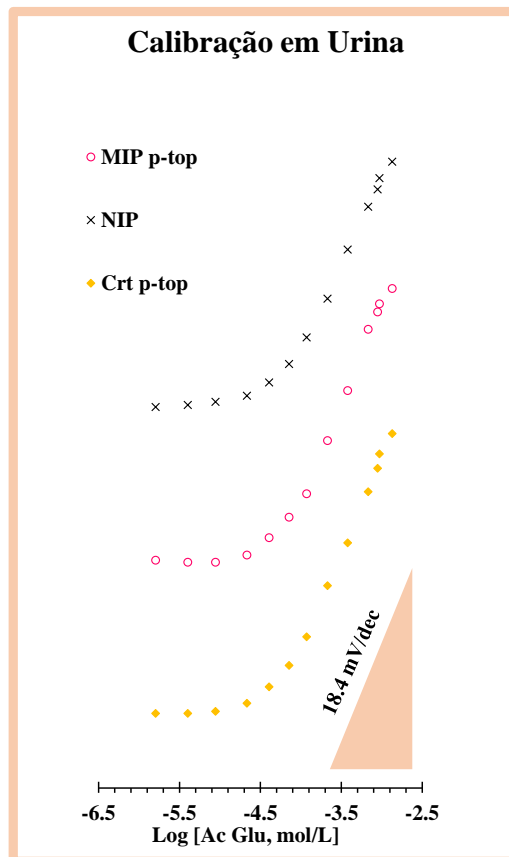


Figura 3. 21- Curvas de calibração de MIP p-top 3% em urina.

Analisando do gráfico da Figura 3.21 pode-se afirmar que o sensor MIP p-top com 3% de sensor tem boa resposta potencimétrica associada a um comportamento linear satisfatório.

3.5.1 Interferentes

O estudo dos interferentes dos ESI seletivos a Ac GLU foi conseguido através do método *matched potential*, sendo calculados os coeficientes de seletividade. A solução estudada tratou-se de uma amostra biológica, a urina, com uma diluição de 100 vezes e. Neste caso, utilizaram-se os seguintes interferentes: ureia, creatinina, glucose e ácido ascórbico e os resultados que se obteve encontram-se apresentados na tabela seguinte, assim como gráficamente na Figura 3.22:

Tabela 3. 11- Interferente e respetivo $\log K_{pot}$.

	Interferente	$\log K_{pot}$
2,0 g/L	Ureia	-0,66
30,0 g/L	Creatinina	-1,56
1,50 g/L	Glucose	-0,06
4,0 g/L	Ácido Ascórbico	-0,49

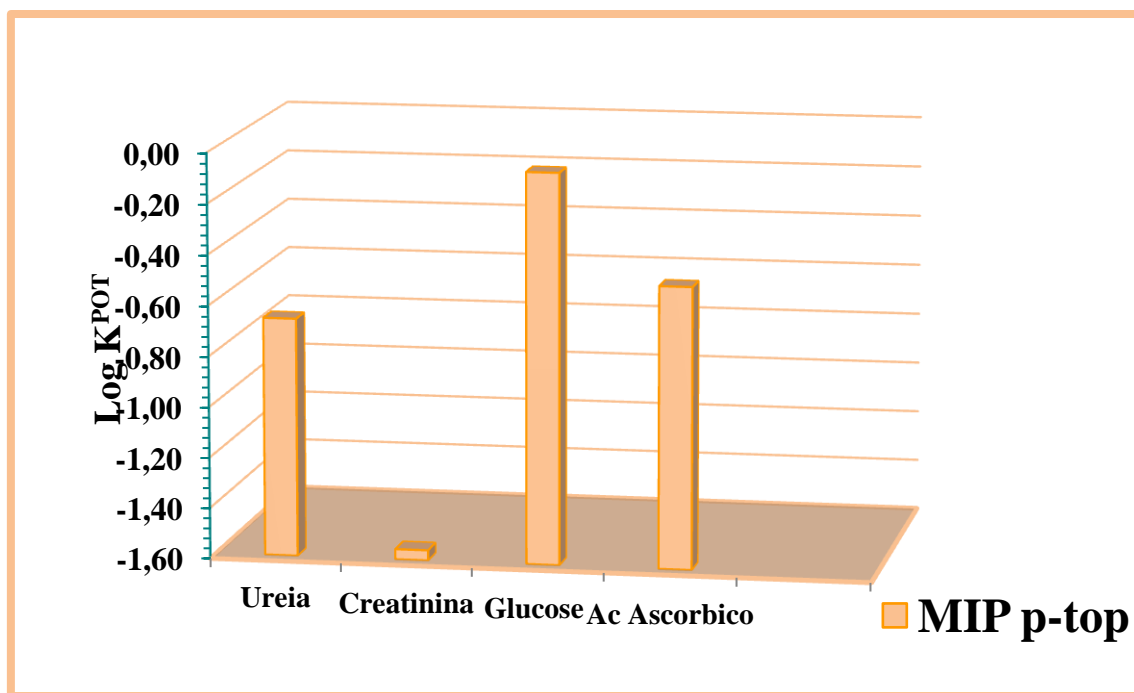


Figura 3. 22- Gráfico dos interferentes.

Analisando a Tabela 3.11 e a Figura 3.22 verifica-se que todos os iões interferentes na solução, não interferem nesta, podendo ser aplicados na amostra sem que haja alteração na resposta potenciométrica, sendo o ESI capaz de distinguir o ácido glutâmico dos restantes iões presentes na solução. Pode-se ainda dizer que o K_{pot} da ureia, da creatinina, da glucose e do ácido ascórbico é 0,2188, 0,0275, 0,8709 e 0,3236 respetivamente.

3.6 Análise de amostras

Este método foi aplicado para determinação do Ac GLU, em amostras de urina na gama $4,04 \times 10^{-5}$ - $1,48 \times 10^{-3}$ mol/L. Houve uma boa concordância entre os valores de Ac GLU que se adicionaram na amostra e os que foram detetados nesta. O erro relativo dos resultados da análise potenciométrica foi de 8,17% para a concentração de $4,04 \times 10^{-5}$ mol/L.

4 Capítulo IV- Conclusões finais

A técnica de polimerização por impressão molecular (polimerização em *bulk*) foi utilizada para a produção de sensores com transdução potenciométrica. A técnica foi realizada com sucesso no que toca à produção de material biomimético com seletividade para o Ac GLU.

A análise dos vários sensores NIP, MIP antes e após remoção bem com a molécula, recorrendo a técnicas como FTIR e EDS sugeriu que de facto a remoção da molécula foi efetuada com sucesso.

A resposta potenciométrica dependeu bastante do pH, exercendo bastante influência nos resultados. Em meio ácido, pH 5, as membranas apresentaram a melhor resposta potenciométrica. As melhores características foram conseguidas com elétrodos com membranas baseadas em material MIP, com a presença de um aditivo, o p-tetraoctophenol e com 3% de sensor.

De uma forma geral o método que se utilizou foi simples de executar, preciso e de baixo custo no que toca a consumos de reagentes e equipamentos.

Presentemente, tendo em conta os resultados obtidos seria interessante estudar de uma forma mais exaustiva a potenciometria para deteção do Ac GLU de forma a conseguir-se aumentar o grau de deteção, tornando o sensor mais seletivo e capaz de detetar o Ac GLU em outros meios com o mínimo de recursos e com erros inferiores.

Futuramente, seria interessante estender esta técnica com o material biomimético a outros iões de forma a poder ser utilizado em contexto clínico.

5 Referências bibliográficas

- [1] Shih, I.L., Van, Y.T., Shen, M.H., Biomedical applications of chemically and microbiologically synthesized poly(glutamic acid) and poly(lysine), *Mini Rev. Med. Chem.*, 4 (2), p. 179–188, 2004.
- [2] Dewald, H.A., Moore, A.M., 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine, a new tumor-inhibitory substance. Preparation of L-, D- and DL-forms, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (15), p. 3941–45, 1958.
- [3] Luzzio, F.A., Mayorov, A.V., Figg, W.D., Thalidomide metabolites. Part 1: derivatives of (+)-2-(N-phthalimido)-c-hydroxyglutamic acid. *Tetrahedron Lett.* 41 (14), p. 2275–78, 2000.
- [4] Cui, C., Zhang, Y., Wang, L., Liu, H., Cui, G., Enhanced anticancer activity of glutamate prodrugs of all-trans retinoic acid, *J. Pharm. Pharmacol.*, 61 (10), p. 1353–58, 2009.
- [5] Stamler, J., Brown, I.J., Daviglus, M.L., Chan, Q., Kesteloot, H., Ueshima, H., Zhao, L., Elliott, P., Glutamic acid—the main dietary amino acid and blood pressure: the INTERMAP study (international collaborative study of macronutrients, micronutrients and blood pressure), *Circulation*, 120 (3), p. 221–28. 2008.
- [6] Zamir, A., Lichtenstein, N. 1955. A colorimetric method for the estimation of glutamic acid in protein hydrolyzates, *Analytica Chimica Acta*, V12 p. 577-79, 1955.
- [7] Daniels, D. H., Diachenko, G.W., Determination of free glutamic acid in a variety of foods by high-performance liquid chromatography, *Food Addit Contam.*, 12(1), p. 21-9, 1995.
- [8] Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) ELISA ALPCO November 30, 2012.

- [9] Gronowski, E.C.C., Wong, T.R., Wilhite, D.L., Martin, C., et al., Detection of Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies with the varelisa ELISA, *Clinical Chemistry*, 1995.
- [10] Riskin, M., Frasconi, M., Nimrod, Y., Willner, I., Stereoselective and Chiroselective Surface Plasmon Resonance (SPR)-Analysis of Amino Acids by Molecularly Imprinted Au-Nanoparticle Composites, *Weinheim Chem. Eur.*, 16, p.7114 – 20, 2010.
- [11] Wang, J., From DNA Biosensors to Gene Chips, *Nucleic Acids Research*, 28(16), p.3011-3016, 2000.
- [12] Pathak, P., Katiyar, V. K., Giri, S., Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research, *AZojono Journal of Nanotechnology Online*, V3, 2007.
- [13] Raiteri, R., Grattarola, M., Berger, R., Micromechanics Senses Biomolecules, *Materials Today*, p.22-29, 2002.
- [14] Turner, A. Biosensors: sense and sensibility, *Chem Soc Rev*, 42(8), p.3184-96, 2013.
- [15] Lee, J.O., et al., Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors, *Anal Bioanal Chem*, V390, p.1023-1032, 2008.
- [16] Chambers, J. P., et al., Biosensor Recognition Elements, *Curr. Issues Mol. Biol.*, V10, p.1-12, 2008.
- [17] Thévenot, D. R., et al., Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification, *Biosensors & Bioelectronics*, V16, p.121-131, 2001.
- [18] Pohanka, M., Electrochemical biosensors-principles and applications, *Journal of Applied Biomedicine*, 6, p.57-64, 2008.

- [19] Luppá, P., Sokoll, L., Chan, D., Immunosensors- principles and applications to clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta*, 314, p:1-26, 2001.
- [20] Holford, T., Davis, F., Recent trends in antibody based sensors, *Biosens Bioelectron*, 34(1), p. 12-24, 2012.
- [21] Moreira, F., Determinação de Norfloxacin em aquaculture, Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências Universidade do Porto, 2009.
- [22] Dickey, F.H., The preparation of specific adsorbents, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 35, p.227-229, 1949.
- [23] Yin, J., Yang, G., Chen, Y., Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its l-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers, *J.Chromatogr. A*, 1090, p.68-75, 2005.
- [24] Takeda, K., Kobayashi, T., Bisphenol A. imprinted polymer adsorbents with selective recognition and binding characteristics, *Sci. Tech. Adv. Mater.*, 6, p.165-171, 2005.
- [25] Svenson, J., Karlsson, J.G., Nicholls, I.A., A nuclear magnetic resonance study of the molecular imprinting of (-)-nicotine: template self-association, a molecular basis for cooperative ligand binding, *J. Chromatogr. A*, 1024, p.39-44, 2004.
- [26] Ekberg, B., Mosbach, K., Molecular imprinting: A technique for producing specific separation materials, *Trends in Biotechnolog.*, 7, p.92-96, 1989.
- [27] Michael, J., Whitecome, M., Rodrigues, E., Villar, P., A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, p.7105-7111, 1995.
- [28] Sellergren, B., Kenneth, J. S., Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers, *J. Chromatogr.*, 635, p31-49, 1993.

- [29] Vlatakis, G., Andersson, L.I., Miller, R., Mosbach, K., Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*, 361, p.645-647, 1993.
- [30] Merkoçi, A., Alegret, S., New materials for electrochemical sensing IV. Molecular imprinted polymers, *TraAC in Analytical Chemistry*, 21, p.717-725, 2002.
- [31] Qiao, F., Sun, H., Yan, H., et al., Molecularly Imprinted Polymers for Solid Phase Extraction, *Chromatographia*, 64, p.625-634, 2006.
- [32] Fuchiwaki, Y., Kubo, I., Electrochemical sensor based on biomimetic recognition utilizing molecularly imprinted polymer receptor, *Biomimetics learning from nature*, Tech, 2010.
- [33] Wang, Y., Jain, V., et al., Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 146, p. 381-387, 2010.
- [34] Kryscio, D., Peppas, N., Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomaterialia*, 8, p.461-476, 2012.
- [35] Mehrvar, M., et al., Fiber-Optic Biosensors – Trends and Advances, *Analytical Sciences*, 16, p.677-692, 2000.
- [36] Mehrvar, M., Abdi, M., Recent Developments: Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors, *Analytical Sciences*, 20, p.1113-1126, 2004.
- [37] Gaua, V., et al., Electrochemical Molecular Analysis without Nucleic Acid Amplification, *Methods*, 37(1), p.73-83, 2005.
- [38] Embrapa agroindústrias tropical, *Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos*. Fortaleza: Documentos,117, 2008.

- [39] Wang, Y., et al., Electrochemical Sensors for Clinic Analysis, *Sensors*, 8, p.2043-2081, 2008.
- [40] Thévenot, D. R., et al., Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification, *Biosensors & Bioelectronics*, 16, p.121-131, 2001.
- [41] Melo, A. F., Desenvolvimento Preliminar de um Biossensor Enzimático para Determinação de Taninos Hidrolisáveis (Dissertação Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- [42] Abbas, M., Mostafa, G., Homoda, A., PVC membrane ion selective electrode for the determination of pentachlorophenol in water, wood and soil using tetrazolium pentachlorophenolate, *Talanta*, p.647-656, 2001.
- [43] Burnett, R., Covington, A., Fogh-Andersen, N., et al., Use of ion-selective electrodes for blood-electrolyte analysis, recommendations for nomenclature, definitions and conventions, *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, p.363-370, 2000.
- [44] Buck, R., Lindner, E., Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes, *International union of pure and applied chemistry*, 66, p.2527-2536, 1994.
- [45] Uslu, B., Ozkan, S., Solid Electrodes in Electroanalytical Chemistry: Present Applications and Prospects for High Throughput Screening of Drug Compounds, *Combinatorial Chemistry e High Throughput Screening*, p.495-513, 2007.
- [46] Buck, R., Lindner, E., Recommendations for nomenclature of Ion-Selective Electrodes, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 66, p.2527- 2536, 1994.
- [47] Moreira, F., Fast screening for diagnostic of heart ischemic episodes, *Dissertação de Doutorado*, Universidade Nova de Lisboa, 2013.
- [48] Bakker, E., Pretsch, E., Modern potentiometry, *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(30), p.5660-5668, 2007.

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

