



Construção de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para a monitorização de Naloxona

FREDERICO TEIXEIRA LOPES

Junho de 2016

Construção de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para a monitorização de Naloxona

Frederico Teixeira Lopes

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

Orientadores

Prof. Doutora Cristina Delerue-Matos

Doutor João Pacheco

Porto, Junho 2015

Construção de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para a monitorização de Naloxona

Frederico Teixeira Lopes nº1080343

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

Orientadores

Prof. Doutora Cristina Delerue-Matos

Doutor João Pacheco

Porto, Junho 2015

Agradecimentos

Ao Doutor Carlos Ramos, coordenador do mestrado de Engenharia de Computação e Instrumentação Médica, à Professora Doutora Cristina Delerue-Matos e ao Doutor Hendrikus Nouws pela simpatia, disponibilidade e oportunidade que me deram de poder desenvolver o meu trabalho no laboratório. Um agradecimento especial ao Doutor João Pacheco pela grande colaboração, disponibilidade e paciência para comigo durante todos estes meses.

Á minha família, em especial aos meus pais que foram a base do meu sucesso e a quem dedico este trabalho, aos meus avós que me deram todas as condições e todo o afeto, aos colegas e amigos que me acompanharam nesta caminhada, a qual não seria possível sem eles. Á minha namorada que foi um verdadeiro pilar e apoio nos momentos mais difíceis mas também nos momentos de maior felicidade. Ao DFI, ao ISEP e a todos os que me apoiaram. Obrigado.

Resumo

A relativa facilidade em aceder a drogas e outras substâncias psicoativas nos dias correntes provocou, à escala mundial, um significativo aumento do número de *overdoses* nos seus consumidores. Devido às consequências graves e por vezes fatais de uma *overdose*, são frequentemente usados fármacos, como a naloxona (NLX), no tratamento destes casos clínicos.

Neste trabalho foi desenvolvido um sensor eletroquímico seletivo, com o objetivo de monitorizar a NLX em amostras de soro humano, Para isso recorreu-se a tecnologia de impressão molecular (MIT) para preparar um polímero seletivo à NLX. Inicialmente procedeu-se a deposição de uma solução de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) em elétrodos “screen printed” de carbono (SPCE). O polímero molecularmente impresso foi obtido através de eletropolimerização por voltametria cíclica de uma solução contendo ácido 4-aminobenzoico (4-ABA) na presença de NLX em tampão fosfato 0,1M pH 7. De seguida procedeu-se à extração da NLX usando uma solução de metanol/HCl 0,1M (50:50). A deteção e quantificação da NLX foram realizadas posteriormente, após incubação de 5 min em soluções de NLX e análise por voltametria diferencial por impulsos (DPV). Foram testadas e otimizadas as condições de polimerização, a concentração de MWCNT depositados, o pH do eletrólito e as condições de extração. O sensor desenvolvido apresenta um comportamento linear entre a intensidade de corrente de pico e a concentração de NLX numa gama entre 0,25 e 10 μ M ($R^2=0,9997$), tendo-se estimado um limite de deteção (LOD) de 0,20 μ M e um limite de quantificação (LOQ) de 0,67 μ M. Para uma concentração de 4 μ M foi obtida uma repetibilidade de 4,6 % e uma reprodutibilidade entre diferentes sensores de 9,6%. A aplicabilidade do sensor foi testada em amostras de soro humano, dopadas com 2 e 8 μ M de NLX tendo-se obtido taxas de recuperação de 98 e 92%, respetivamente.

O sensor desenvolvido é barato, de fácil fabrico, descartável e apresenta boa performance analítica para deteção de NLX em amostras reais.

Palavras – chave: Opióides, Naloxona, sensor eletroquímico, polímero molecularmente impresso, voltametria, eletropolimerização

Abstract

The relative ease of access to drugs and other psychoactive substances in current days caused, worldwide, a significant increase in the number of overdoses in their consumers. Due to the serious and sometimes fatal consequences of an overdose, drugs are often used, such as naloxone (NLX) in the treatment of such clinical cases.

In this work a selective electrochemical sensor in order to monitor the NLX in human serum samples for that resorted to molecular imprinting technology (MIT) to prepare a selective polymer NLX. Initially carried by the deposition of a solution of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) on electrodes "screen printed" carbon (SPCE). The molecularly imprinted polymer was obtained by cyclic voltammetry by electropolymerization of a solution containing 4-aminobenzoic acid (4-ABA) in the presence of NLX in 0.1M phosphate buffer pH 7. Then it proceeded to the extraction using a solution NLX methanol / HCl 0.1M (50:50). The detection and quantification of NLX were subsequently carried out after incubation 5 min in NLX solutions and analysis by differential pulse voltammetry (DPV). They were tested and optimized the polymerization conditions, the concentration of MWCNT deposited, measuring the pH of the electrolyte and extraction conditions. The sensor developed has a linear relationship between the intensity of the peak current and the concentration of NLX in the range of 0.25 to 10 μ M ($r^2 = 0.9997$), having estimated a detection limit (LOD) of 0,20 μ M and one limit of quantitation (LOQ) of 0,67 μ M. At a concentration of 4 μ M 4.6% repeatability and reproducibility between different sensors of 9.6% was obtained. The applicability of the sensor was tested in samples of human serum, and 2 doped with 8 μ M of NLX thereby obtaining recovery rates of 98 and 92%, respectively.

The developed sensor and cheap, easy to manufacture, disposable, and has good analytical performance for NLX detection in real samples.

Key-words: Opioids, Naloxone, electrochemical sensor, molecularly imprinted polymer, voltammetry, electropolymerization

Índice

Agradecimentos	- 5 -
Resumo	- 7 -
Abstract.....	- 9 -
Índice	ii
Índice de figuras	iv
Índice tabelas	v
Acrónimos	vi
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento	2
1.2. Fármacos.....	3
1.2.1. Opioides	3
1.2.2. Naloxona	5
1.3. Sensores	9
1.3.1. Sensores eletroquímicos	10
1.4. Técnicas voltamétricas	11
1.4.1. Voltametria Cíclica	13
1.4.2. Voltametria Diferencial de Pulso	14
1.4.3. Voltametria de Onda Quadrada	15
1.5. Elérodos	17
1.6. Elérodos modificados	17
1.7. Polímeros Molecularmente Impressos	18
1.7.1. Processo de polimerização	19
1.7.2. Tipo de ligações para preparação de um MIP	20
1.7.3. Técnicas de polimerização	21
1.7.4. MIP eletroquímicos	22
1.7.5. Aplicações dos MIP	23
1.8. Motivação e Objetivos.....	24
1.9. Organização do relatório	25
2. Materiais e métodos	26

2.1. Reagentes.....	27
2.2. Soluções.....	27
2.3. Equipamento.....	28
2.4. Preparação do sensor.....	28
2.5. Medições eletroquímicas.....	29
2.6. Preparação de amostras.....	30
3. Resultados e discussões.....	31
3.1. Comportamento eletroquímico da NLX.....	32
3.2. Impressão molecular da NLX.....	34
3.3. Caracterização morfológica por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).....	36
3.4. Comportamento eletroquímico da NLX no MIP/MWCNT/SPCE.....	38
3.4.1 Otimização da concentração dos MWCNTs.....	39
3.4.2. Otimização da concentração do pH de medição.....	41
3.5. Otimização das condições de polimerização e funcionamento do MIP.....	42
3.5.1 Otimização da concentração de 4-ABA.....	42
3.5.2. Otimização da concentração de NLX.....	44
3.5.3. Otimização do número de ciclos de polimerização.....	45
3.6. Performance Analítica do sensor.....	48
3.7. Aplicação em amostras.....	49
4. Conclusão.....	51
Bibliografia.....	54

Índice de figuras

Figura: 1.1 - Ilustração de opiodes ligados a recetores neuronais.	4
Figura: 1.2 - Estojo portátil Naloxona [13].	8
Figura: 1.3 - Ilustração de moléculas Naloxona ligadas a recetores opióticos.	9
Figura: 1.4 - Esquema genérico de funcionamento de um sensor.	10
Figura: 1.5 - Esquema genérico de funcionamento de um sensor químico.	11
Figura: 1.6 - Voltamograma Cíclico de um sistema reversível (adaptado) [20].	13
Figura: 1.7 - Sinal de excitação para a voltametria diferencial de impulso [19].	14
Figura: 1.8 - Voltamograma DPV [19].	15
Figura: 1.9 - Sinal de excitação para a voltametria SWV [19].	16
Figura: 1.10 - Voltamograma SWV [19].	16
Figura: 1.11 - Representação genérica do processo de polimerização.	20
Figura: 2.1 - Esquema de preparação e funcionamento do sensor	29
Figura: 5.1 - Variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de NLX entre 0,25 e 10 μ M.	33
Figura: 5.2 - (A) Electropolimerização de um MIP a partir de uma solução de 20mM 4-ABA, 0,5mM NLX em tampão fosfato 0,1M pH 7 durante 20 ciclos; (B) 1º ciclo de um NIP (a), 1 ciclo de um MIP (b), ultimo ciclo de NIP (c) e ultimo ciclo de um MIP (d)	34
Figura: 5.3 - DPV em tampão fosfato 0,1M pH 7 de um NIP (a) e MIP (b) apos polimerização.	36
Figura: 5.4 - Imagens SEM de (A) SPCE, (B) MIP/SPCE, (C) MWCNT/SPCE e (D) MIP/MWCNT/SPCE	37
Figura: 5.5 - Voltamogramas correspondentes a oxidação da NLX em diferentes eléctrodos: a) NIP/SPCE; b) MIP/SPCE, c) NIP/MWCNT/SPCE e d) MIP/MECNT/SPCE	38
Figura: 5.6 - Variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de MWCNT colocados no SPCE	40
Figura: 5.7 - Variação da intensidade e potencial do pico em função do pH da solução de medição.	41
Figura: 5.8 - Variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de polímero (4-ABA) usado durante a polimerização.	43
Figura: 5.9 - Variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de NLX usado durante a polimerização.	44
Figura: 5.10 - Variação da intensidade de corrente do pico em função do número de ciclos de polimerização.	45
Figura: 5.11 - Variação da intensidade de corrente do pico em função do solvente de extração.	47
Figura: 5.12 - Variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de NLX entre 0,25 e 10 μ M.	48
Figura: 5.13 - Voltamogramas obtidos na aplicação do sensor em amostras de soro humano: (a) amostra; (b) amostra dopada.	49

Índice tabelas

Tabela: 1.1 - Principais formas de administração da naloxona e respectivo tempo para surgir efeito.....	6
Tabela: 1.2 - Principais efeitos secundários da naloxona e sua frequência de ocorrência.	7
Tabela: 5.1 - Recuperações obtidas para aplicação do MIP/MWCNT/SPCE em amostras de soro humano.....	50

Acrónimos

NLX	Naloxona
MIT	Tecnologia de impressão molecular
MWCNT	Nanotubos de carbono de parede múltipla
SPCE	Screen printed carbon electrode
4 – ABA	4 – Aminobenzóico
DPV	Voltametria diferencial por impulso
CV	Voltametria cíclica
LOQ	Limite de quantificação
LOD	Limite de deteção
MIP	Polímero molecularmente impresso
SWV	Voltametria de onda quadrada
DDS	Drug delivery system
GCE	Eléctrodo de carbono vítreo
NIP	Polímero molecularmente não impresso
SEM	Microscopia electrónica de varrimento

1. Introdução

1.1. Enquadramento

No ano de 2014, em Portugal, morreram cerca de duzentas pessoas devido a presença de substâncias ilícitas no organismo, algumas das quais com overdose, tendo a taxa de mortalidade por overdose aumentado em torno dos 50% face ao ano anterior. Entre as substâncias detetadas, destaca-se uma maior percentagem de cocaína, seguido dos opiáceos e metadona. [1] Embora com valores ainda residuais, a ocorrência de casos de overdose com a presença de drogas sintéticas começa a ser verificada.

De forma a diminuir esta elevada taxa de mortalidade verificada, o uso de antagonistas de opióides e drogas, como a naloxona, tem sido aplicado nos pacientes com sintomas de overdose. A naloxona é um fármaco que atua quimicamente no organismo, ligando-se aos recetores opiáceos do corpo humano impedindo que as moléculas das drogas se liguem aos mesmos provocando paragens cardiorrespiratórias. A administração da naloxona em pacientes é relativamente simples e é feita maioritariamente via intravenosa devido à rápida atuação. No entanto, estes procedimentos não permitem uma avaliação conclusiva do estado real do paciente, nem do grau de overdose em que se encontra.

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos para controlo e monitorização clínica é cada vez mais importante. Estes dispositivos têm como função detetar determinada magnitude física ou química, convertê-la num sinal elétrico que se pretende medir. Os sensores são facilmente aplicados na monitorização de amostras de fluidos biológicos como sangue ou urina, e têm uma precisão e rapidez de resposta elevadas. Nesse âmbito, o desenvolvimento de sensores visa obter dispositivos cada vez mais sensíveis, seletivos e económicos para melhorar o controlo e monitorização dos fenómenos que se pretende observar.

1.2. Fármacos

1.2.1. Opioides

O ópio é extraído das cápsulas da planta *Papaver somniferum*, popularmente conhecida como papoila. Através de uma incisão na cápsula, obtém-se o látex. Em cada cápsula de papoila pode ser recolhida entre 10 a 100 mg de ópio. Este composto contém mais de 20 alcaloides ativos, entre os quais se destacam a morfina que aparece em maior percentagem, a codeína e a noscapina, sendo que estas em proporções menores. [2] O ópio tem propriedades analgésicas e é essencialmente utilizado na medicina, no tratamento de dores moderadas e intensas que surgem de doenças ou traumas pós-operatório. A partir do ópio podem ser produzidos três tipos de compostos diferentes:

- **Opiáceos naturais** - São os compostos que não sofrem nenhuma modificação, nos casos da morfina e codeína;
- **Opiáceos semissintéticos** - Resultantes de modificações parciais das substâncias naturais, como a heroína que é obtida através de uma modificação química da morfina.
- **Opioides** - Fabricados em laboratórios e totalmente sintéticos, tem ação semelhante à dos opiáceos. Meperidina, opropoxifeno e metadona são exemplos de opioides.

Nos dias correntes, os opioides como certas drogas, são utilizados ilicitamente para uso pessoal na procura de um estado de transe, o que muitas vezes provoca sobre doseamento no organismo dos consumidores, ou seja, uma overdose. No cérebro, mais concretamente nos neurónios do bulbo raquidiano, que controlam o ritmo respiratório, estão presentes numerosos recetores de opioides. [3, 4] Uma overdose ocorre quando uma grande quantidade de opioides se ligam a esses recetores presentes no cérebro, provocando a paragem da ventilação pulmonar.

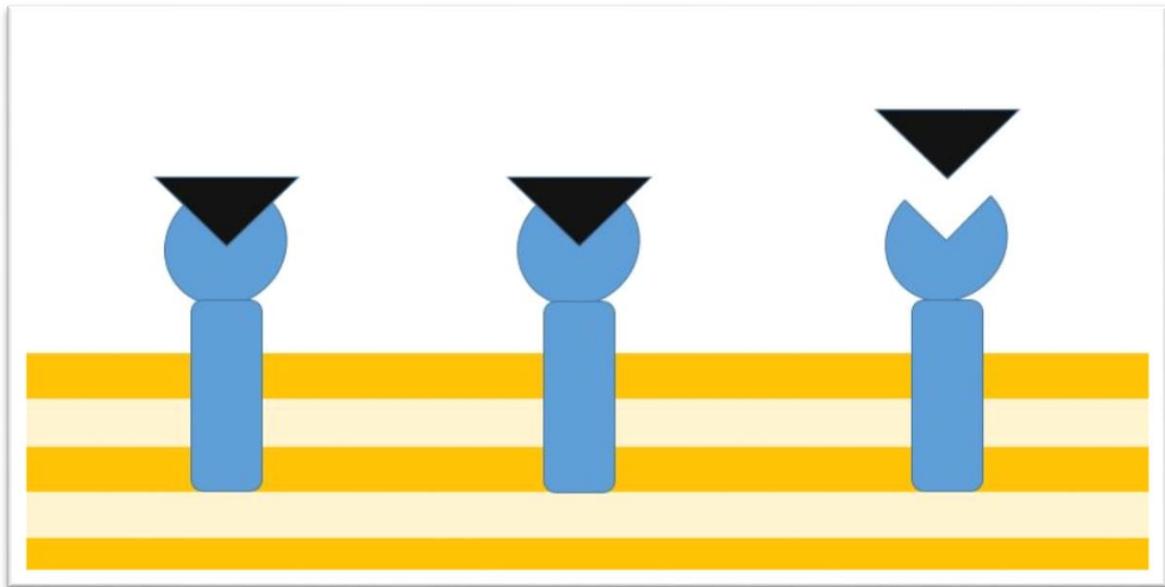


Figura: 1.1 - Ilustração de opióides ligados a recetores neuronais

Os recetores são macromoléculas, mais concretamente proteínas, que se ligam aos opióides e que desencadeiam uma atividade biológica resultante dessa ligação. Estes recetores têm como função receber moléculas presentes nos medicamentos. São chamados de agonistas os compostos que provocam atividade biológica, como as drogas ou opióides e de modo contrário, são denominados antagonistas os que bloqueiam essas atividades. Estes dois compostos possuem estruturas semelhantes, o que permite a antagonistas como a naloxona, se ligar ao recetor do agonista, sem no entanto produzir qualquer efeito adverso.

Existem três tipos de recetores opióides: Recetores μ , Recetores κ e Recetores δ . Todos eles apresentam uma estrutura semelhante e são acoplados a proteína G. A origem destes nomes tem um propósito. [5] A morfina foi o primeiro opióide descoberto a ligar-se a estes recetores μ que é letra do alfabeto grego correspondente a m. Da mesma forma, Ketocyclazocine foi o primeiro opióide a ligar-se ao recetor κ dando origem ao nome do recetor.

Os recetores μ são os mais relevantes e estão distribuídos por todo o encéfalo. Têm como funções relacionarem-se com a integração motora-sensorial e percepção da dor. Os recetores δ tem uma distribuição mais limitada e encontram-se nas áreas relacionadas principalmente com o olfato, neocórtex e amígdala. Estes recetores têm papel na integração motora e função cognitiva. Os recetores κ são observados com maior prevalência no hipotálamo e hipófise e tem um papel relacionado com balanço hídrico, ingestão alimentar, percepção dolorosa e atividade neuroendócrina.

Paralelamente à descoberta dos recetores opioides, foram igualmente identificadas ligações endógenas tais como as β -endorfina, encefalinas e dinorfinas que se ligavam a eles. As ligações com o recetor μ são feitas pela β -endorfina, met-encefalina e dinorfina A1-13; O recetor δ liga-se com β -endorfina, leu-encefalina e dinorfina A1-8; o recetor κ é o alvo principal de ligação das dinorfinas. Estas substâncias são peptídeos, divididos em 3 famílias, cada uma originada a partir de um gene diferente. [6, 7] Estes genes orientam o código de síntese de uma grande proteína precursora a partir da qual os vários peptídeos ativados são separados. Estas substâncias endógenas que se ligam aos recetores opioides aparecem em células e áreas diversas do sistema nervoso central.

1.2.1.1. Mecanismo da ação dos opioides

Os recetores opioides são ligados às proteínas G. A ativação dessa proteína desencadeia uma série de eventos: fecho dos canais de cálcio dos neurónios pré-sinápticos, redução da produção de monofosfato de adenosina cíclico (AMPs) e abertura dos canais de potássio dos neurónios pós-sinápticos, o que se traduz em hiperpolarização celular. [2] Assim, o efeito final é a redução da excitabilidade neuronal, resultando em redução da neurotransmissão de impulsos nociceptivos.

1.2.2. Naloxona

Sintetizado na década de 60, a naloxona é um fármaco antagonista de opioides tais como heroína e morfina, muito utilizado no campo paramédico nos casos suspeitos de envenenamento por overdose. Detentor de uma grande afinidade como os recetores de opioides, a naloxona liga-se a esses mesmos recetores, revertendo temporariamente o efeito do opioide no corpo humano. O principal papel deste fármaco é ajudar o restabelecimento normal da ventilação pulmonar.

A naloxona pode ser administrada de diversas formas. A mais utilizada pelos médicos e a que requer menos tempo de atuação é a via intravenosa (IV). Vias alternativas como a intramuscular (IM), subcutânea (SQ), endotraqueal (ET), inalatória (IT) e nebulização (NB) tem sido igualmente utilizadas mas requerem um espectro temporal maior para se verificarem os efeitos pretendidos nos pacientes. O início da ação é variável e depende

do meio de administração utilizado. A ação da naloxona apresenta curto tempo de duração, variando entre 30 e 120 minutos.

Tabela: 1.1 - Principais formas de administração da naloxona e respetivo tempo para surgir efeito

Formas de administração	Tempo para surgir efeito (minutos)
Intravenosa (IV)	2
Intramuscular (IM)	2 – 5
Sub-cutânea (SQ)	2 – 5
Endotraqueal (ET)	2 – 5
Nebulização (NB)	5
Inalatória (IT)	8 – 13

A administração da naloxona via IV, IM e SQ possui, no entanto, maiores riscos de contaminação sanguínea, com doenças tais como hepatite e HIV, por serem utilizadas seringas na sua administração. Nesse sentido, o método intranasal (IN) surge para minimizar esses riscos, tendo como grande vantagem um espectro de tempo de efeito semelhante e com biocompatibilidade similar ao método intravenoso. Este modo IN tem sido considerado pelos médicos hospitalares como uma forte alternativa ao IV. [8]

A naloxona é comercializada em ampolas de 1 ml com concentração de 0,4mg/ml. As ampolas podem ser diluídas posteriormente em 9 ml de cloreto de sódio (NaCl) 0.9%, obtendo-se uma concentração de 0,04 mg/ml, ou conforme as instruções da instituição que comercializa o produto. Este fármaco não sofre qualquer tipo de alterações nas suas funções quando utilizado com soro fisiológico nos casos em que se optar por infusão contínua.

A dose inicial para os métodos de administração IV, IM, SC varia entre 0,4 a 3 mg e pode ser repetida em períodos de dois ou três minutos até se verificar a reversão dos sintomas. Doses adicionais podem ser necessárias consoante o tipo de opioide utilizado, em consequência da meia-vida dos opioides ser superior à da naloxona. [9]

As doses adicionais podem provocar morbidade nos doentes e por esse motivo requerem maior precaução por parte dos profissionais de saúde, visto que pacientes com graves intoxicações podem recuperar a respiração espontânea e o nível de consciência logo após a dose inicial. [10]

Como todos os medicamentos, a naloxona pode provocar efeitos secundários [11], no entanto não se verificam em todas as pessoas. Na Tabela 1.2 estão indicados os principais efeitos secundários que podem ser verificados, bem como a sua frequência de ocorrência.

Tabela: 1.2 - Principais efeitos secundários da naloxona e sua frequência de ocorrência [11].

Efeitos secundários da naloxona		Frequente	Raro
Doenças do sistema imunitário	Urticária		X
	Constipação		X
	Dificuldade Respiratória		X
	Edema de Quincke		X
Doenças do sistema nervoso	Tonturas	X	
	Dores de cabeça	X	
	Tremores		X
	Suores		X
	Convulsões		X
Cardiopatias	Ritmo cardíaco acelerado	X	
	Fibrilhação		X
	Paragem cardíaca		X
Vasculopatias	Pressão sanguínea instável	X	
Doenças respiratórias, torácicas e do mediastino	Edema pulmonar		X
Doenças gastrointestinais	Nauseas	X	
	Vómitos	X	
	Diarreia		X

Pesquisas recentes retiraram a responsabilidade atribuída inicialmente a naloxona no aparecimento de arritmias cardíacas e convulsões em doentes, já que essas complicações por proveniência do fármaco são muito raras. A naloxona não causa habituação e não produz quaisquer efeitos psicofarmacológicos em doentes que sejam administrados de

forma mais recorrente. Em grávidas deve ser administrado com alguns cuidados uma vez que chega à placenta, no entanto, ainda se desconhece a sua influência na qualidade do leite materno.

Incentivando os usuários a ligar para as urgências em caso de overdose de opioides é um procedimento essencial para a redução da mortalidade. Em alternativa a esse procedimento primário, surgem, com apoio dos médicos, estratégias de sensibilização e formação de primeiros socorros para combater a taxa de mortalidade por overdoses de opioides, prescrevendo a naloxona num estojo portátil (Figura: 1.2) para uso doméstico. [12, 13]



Figura: 1.2 - Estojo portátil Naloxona [13]

1.2.2.1. Ação da Naloxona nos recetores opióiticos

A ação da naloxona ainda não está totalmente compreendida pela comunidade científica. Como já foi anteriormente referido, ao ligar-se aos recetores, a naloxona bloqueia as ligações dos opioides, permitindo o restabelecimento da ventilação pulmonar e inversão da overdose [14]. Na Figura 1.3 ilustra-se a ligação de moléculas de naloxona a recetores opióiticos, bloqueando assim a ação dos opióides.

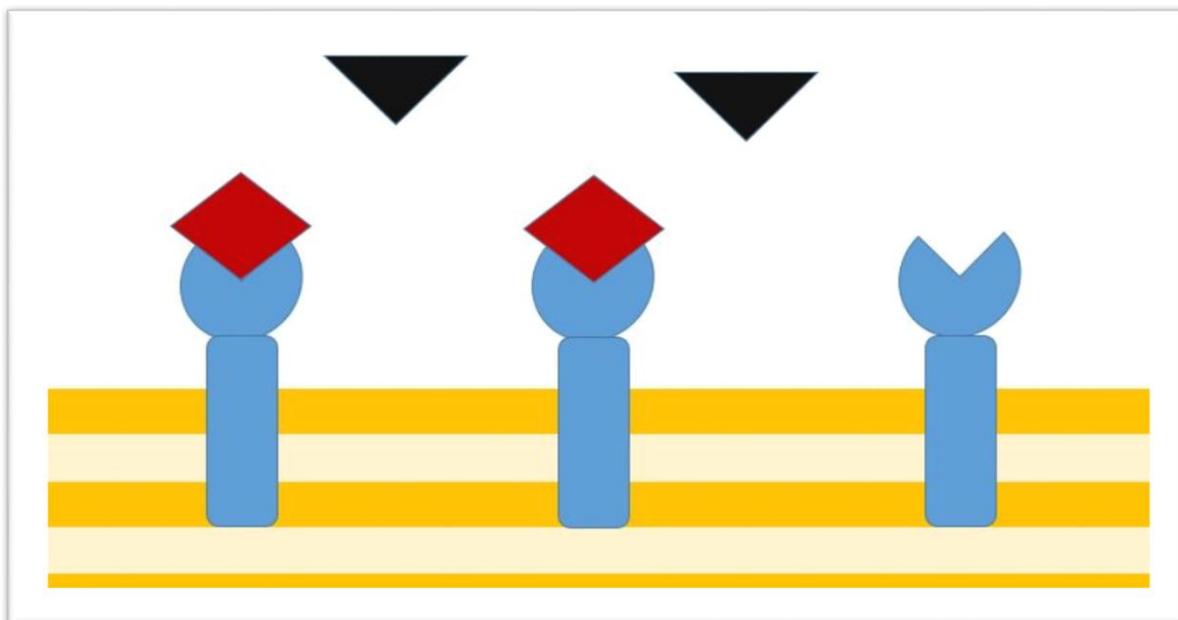


Figura: 1.3 - Ilustração de moléculas Naloxona ligadas a recetores opióticos

1.3. Sensores

Os sensores são dispositivos capazes de fornecer informação química ou física de um sistema de forma contínua, convertendo essa informação num sinal elétrico no caso de sensores eletroquímicos. Existem várias possibilidades para preparar o elemento sensor, como por exemplo a utilização de um sistema biológico no caso de uma enzima ou anticorpo, ou de polímeros molecularmente impressos (MIP), em que a deteção é realizada através da interação entre os analitos e o MIP. Um sensor é constituído por três componentes principais. Um recetor sensível que capta um sinal com uma determinada natureza física, um transdutor que pode ser, entre outros, eletroquímico, ótico, piezoelétrico e térmico, que converte o sinal obtido num sinal elétrico e um amplificador de sinal que permite tornar o sinal mais visível e minimizar o ruído externo que possa existir devido as interferências ambientais, ou provocado pelos equipamentos envolvidos na captura e medição dos sinais.

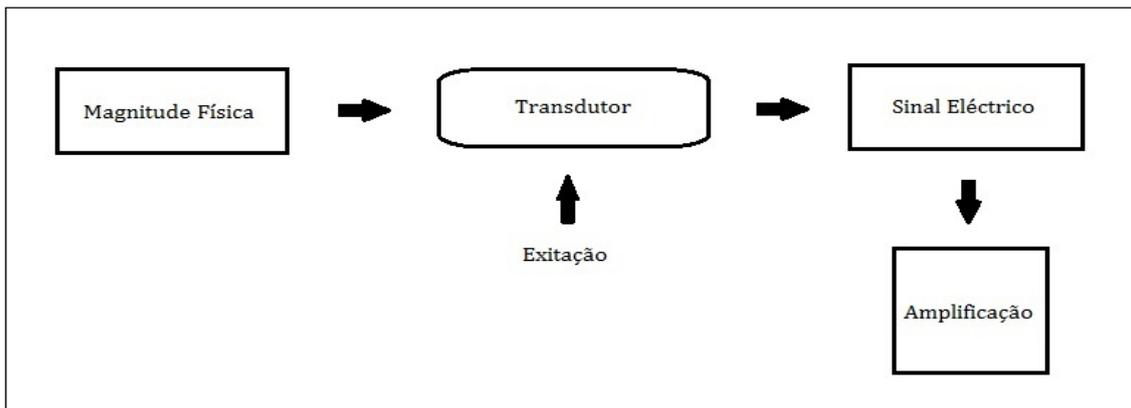


Figura: 1.4 - Esquema genérico de funcionamento de um sensor

Tendo em conta o tipo de medida a que se destinam, os sensores existentes podem ser classificados como físicos ou químicos. Os sensores físicos medem propriedades de natureza física como viscosidade, temperatura, índice de refração entre outras. Sensores químicos reconhecem constituintes químicos, como a concentração de determinada substância a qual chamamos de analito. [15] A efetiva capacidade do sensor em discriminar o analito constitui um aspeto de grande importância na fabricação de sensores químicos, os quais possuem características vantajosas tais como portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização e baixo custo. No presente trabalho aborda-se apenas com maior detalhe os sensores eletroquímicos, os quais foram utilizados durante todo o projeto.

1.3.1. Sensores eletroquímicos

O avanço da tecnologia ampliou exponencialmente os domínios de aplicação da eletroanalítica, em particular, no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior crescimento, devido aos novos desafios impostos, entre outras, pelas áreas da indústria, medicina, farmácia e ambiente. Revela-se necessário o desenvolvimento e fabrico de novos sensores com melhores características como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade.

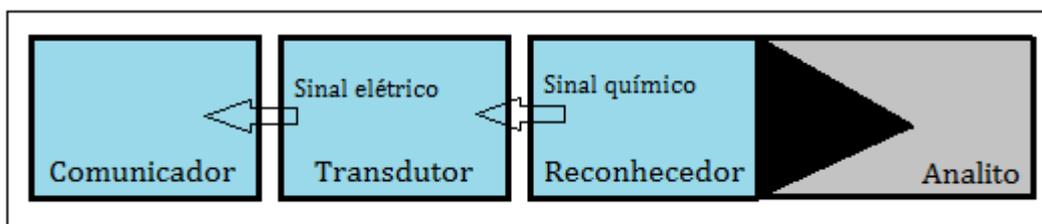


Figura: 1.5 - Esquema genérico de funcionamento de um sensor químico

A obtenção de informação analítica, depende essencialmente da capacidade de reconhecimento seletivo da membrana que entra em contacto com o analito (Figura 1.5). Há inúmeras alternativas de imobilização desta membrana na superfície do sensor, que envolve a necessidade de processos químicos que por sua vez viabilizem a transdução do sinal para o detetor. O sinal transmitido deve ser tratado e ampliado, ou seja, minimizar-se o efeito de interferências externas que possam afetar o sinal medido.

O desenvolvimento de sensores, em particular os eletroquímicos, têm apresentado um acentuado crescimento nos últimos anos, dado que possibilitam testes analíticos simples, rápidos e de baixo custo em concentrações de amostras muito baixas. [16] Com o objetivo de se alcançar as características desejadas para estes sensores, justifica-se seguir determinados métodos eletroquímicos e estratégias de modificação da superfície do eléctrodo, quer para fins de eletrocatalise, como para restrição da passagem de espécies interferentes visando melhores resultados. [17] Estas estratégias, assim como os principais métodos eletroquímicos existentes serão abordados de seguida.

1.4. Técnicas voltamétricas

Com origem na Checoslováquia em meados do século XX, as bases das técnicas voltamétricas foram inicialmente estudadas por meio de sistemas envolvendo eléctrodos de mercúrio, aplicados ao estudo de processos envolvendo iões metálicos em soluções. Nestes sistemas, parâmetros qualitativos e quantitativos eram observados, permitindo as suas aplicações na identificação e quantificação de diferentes componentes em diversas matrizes.

Atualmente, os sistemas eletroquímicos recebem contribuições significativas devido ao avanço da Química e principalmente da Eletrónica. Novos componentes mais robustos e versáteis, com baixo custo, transformam sistemas inicialmente complexos em

equipamentos de fácil utilização. As técnicas voltamétricas apresentam-se como alternativas a várias aplicações em química analítica em diversas áreas tais como farmacêutica, alimentar, ambiente entre outras.

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registo de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie num sistema constituído, no mínimo, por dois elétrodos; um eléctrodo de trabalho e um eléctrodo de referência. O potencial aplicado entre os dois elétrodos sofre variações de velocidade constante em função do tempo. As informações sobre o analito são obtidas através da medição da magnitude da corrente eléctrica, induzida pelo potencial eléctrico, e obtida pela transferência de electrões durante um processo de oxirredução entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência. O potencial e a corrente resultante são registados em simultâneo. A curva obtida entre estas duas grandezas eléctricas é chamada de voltamograma. [18]



Equação: 1.1 - Reação de oxirredução.

Considerando a reação de oxirredução (Equação:1.1) no sentido direto, à medida que a espécie oxidada “O” sofre redução, há um decréscimo da concentração “O” à superfície do eléctrodo e surge um fluxo de “O” a partir da solução para a interface eléctrodo-solução devido à criação do gradiente de concentração, gerando corrente eléctrica. À medida que o potencial se torna mais negativo, ou seja, no varrimento catódico, a energia dos electrões aumenta e o eléctrodo funciona como uma fonte de electrões que fluirão para a solução, dando origem à redução da espécie eletroativa na interface eléctrodo-solução. No sentido inverso, no varrimento anódico para potenciais mais positivos é favorecida a oxidação da espécie eletroativa. A corrente obtida é composta por duas componentes. A corrente faradáica, proveniente da reação de oxirredução e a corrente capacitiva, que é a corrente necessária para carregar a dupla camada eléctrica existente na interface eléctrodo/solução. Existem diversos métodos voltamétricos, onde se destacam a voltametria cíclica, a voltametria de varrimento linear e a voltametria diferencial de pulsos. A escolha da técnica voltamétrica está relacionada com o tipo e qualidade de informação quantitativa-qualitativa que se quer obter. [19] Nos subcapítulos seguintes, serão descritas apenas as técnicas utilizadas neste trabalho.

1.4.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (CV) é uma das técnicas voltamétricas mais utilizadas na obtenção de informação qualitativa e quantitativa sobre processos eletroquímicos. As principais vantagens da CV estão no rápido fornecimento de informações sobre os processos redox, tais como a reversibilidade de processos, a cinética de reações de transferência eletrônica, reações químicas acopladas ou processos de adsorção.

Esta técnica consiste no varrimento de potencial do eletrodo de trabalho utilizando uma rampa triangular simétrica. Neste caso, o sinal de excitação compreende um varrimento linear de potencial num sentido desde um valor inicial até um valor considerado como um potencial de retorno. A este valor a direção do varrimento de potencial é invertida, ocorrendo então um novo varrimento linear de potencial, agora no sentido inverso, até um valor final que pode, ou não, coincidir com o valor inicial. [20]

Os parâmetros eletroquímicos mais importantes a ter em conta nesta técnica são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as intensidades de corrente do pico catódico e anódico (i_{pc} e i_{pa}) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$), que podem ser visualizados na Figura 1.6.

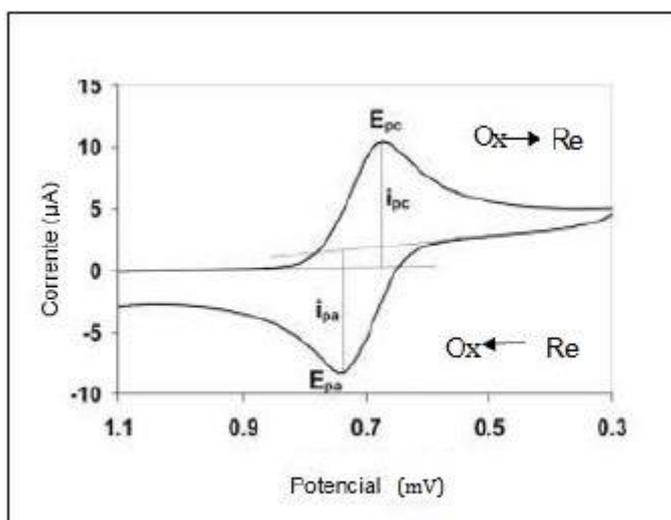


Figura: 1.6 - Voltamograma Cíclico de um sistema reversível (adaptado) [20]

Estes parâmetros são fundamentais para caracterizar o tipo de processo que ocorre. Quando o varrimento de potencial catódico é seguido pelo anódico, ou seja, quando

ocorre a reação no sentido inverso, a espécie reduzida formada pode ser oxidada, o que origina dois picos no voltamograma como pode ser visualizado na Figura 1.6.

1.4.2. Voltametria Diferencial de Pulso

A voltametria diferencial de impulsos (DPV) consiste em pequenos pulsos de amplitude constante sobreposta numa onda em forma de escada (Figura 1.7). Nesta técnica, a medição da corrente é efetuada antes da aplicação do pulso e no final do pulso. O propósito de se realizar duas medições da corrente e trabalhar com a diferença entre elas é a correção da corrente capacitiva. À medida que se aplica o pulso, há uma maior contribuição das correntes capacitiva e faradaica e nesse sentido, a segunda medição serve para minimizar a corrente capacitiva e privilegiar a faradaica. [19]

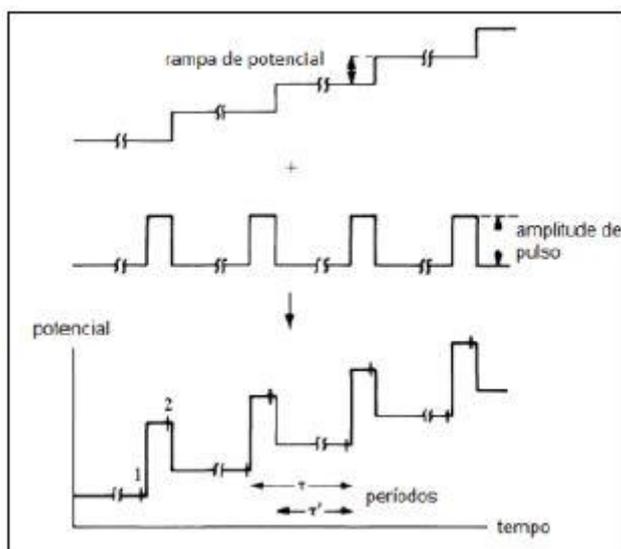


Figura: 1.7 - Sinal de excitação para a voltametria diferencial de pulso [19]

Relativamente à análise da corrente final, ela é obtida através da subtração da corrente medida antes da aplicação do pulso e a corrente medida no final do pulso. A diferença de correntes é representada graficamente em função do potencial aplicado. O voltamograma da DPV (Figura 1.8) apresenta picos de corrente gaussiana, cuja área e altura do pico são diretamente proporcionais em determinadas condições, à concentração do analito.

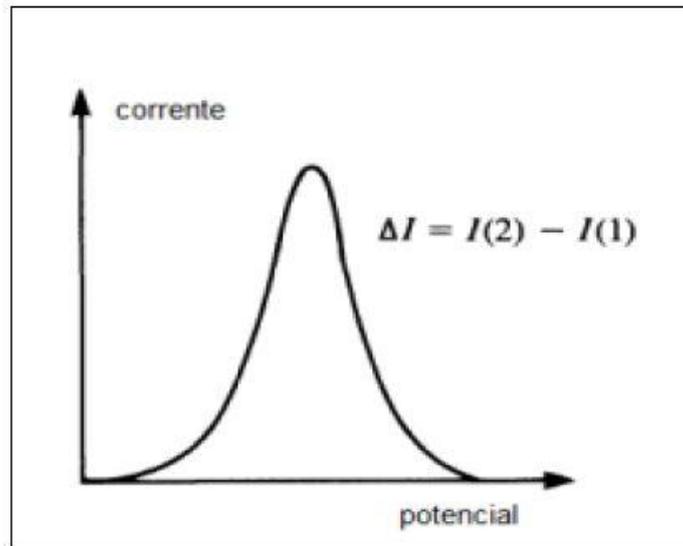


Figura: 1.8 - Voltamograma DPV [19]

1.4.3. Voltametria de Onda Quadrada

Na voltametria de onda quadrada (SWV), uma onda quadrada simétrica de amplitude ΔE_p sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada caracterizada pela amplitude ΔE_s , largura a e período π é aplicada ao eletrodo de trabalho (Figura 1.9). A corrente é amostrada em duas ocasiões: no final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção do varrimento, e no final do pulso inverso, onde a direção do pulso é contrária à direção do varrimento. De forma semelhante à DPV, esta dupla medição da corrente garante uma menor contribuição da corrente capacitiva.

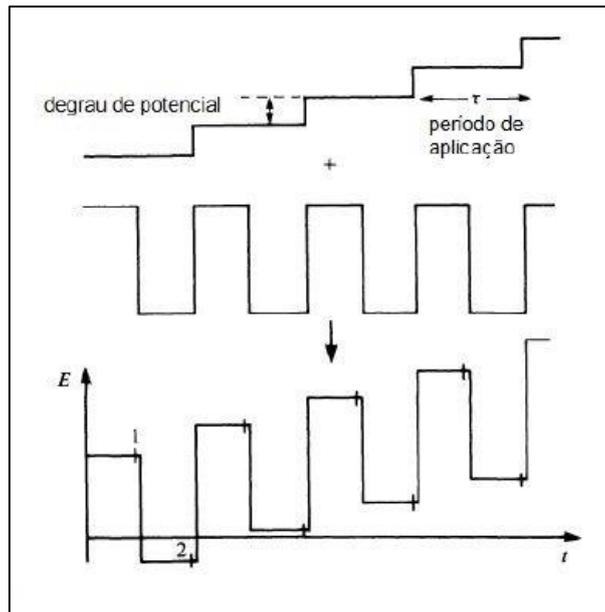


Figura: 1.9 - Sinal de excitação para a voltametria SWV [19]

O voltamograma resultante consiste da diferença entre as correntes. Na Figura 1.10 está representado o pico de corrente resultante da voltametria de onda quadrada. A sensibilidade desta técnica é comparável com a da DPV, no entanto com uma maior velocidade de aquisição dos dados. [19] Elevadas frequências permitem o uso de velocidades de varrimento de potencial extremamente rápidas.

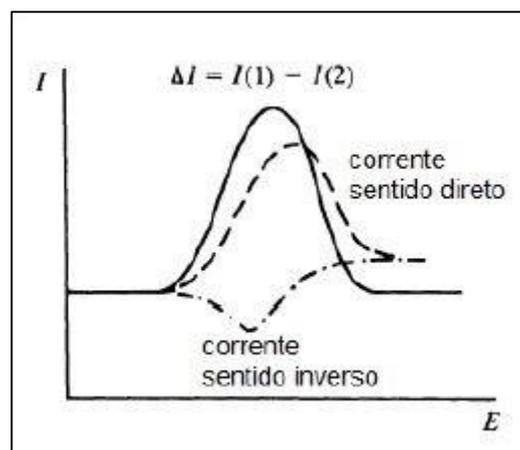


Figura: 1.10 - Voltamograma SWV [19]

1.5. Eléttodos

O eléttodo que serve de base na análise voltamétrica é um dispositivo de elevada importância neste contexto. É na superfície do mesmo que todas as reações ocorrem. Torna-se, portanto, necessário escolher um eléttodo de trabalho com propriedades físicas e/ou químicas adequadas.

Existe uma variedade de materiais utilizados em eléttodos de trabalho onde metais nobres, carbono e ouro apresentam-se como os mais usados atualmente. O carbono figura como um dos materiais mais utilizados dado a sua ampla janela de potencial onde podem ser usados, baixa corrente de fundo, superfície química rica e baixo custo. O ouro também tem sido bastante utilizado, pois possui igualmente uma ampla gama de potencial e é quimicamente inerte. [21]

1.6. Eléttodos modificados

Os processos redox que ocorrem nos eléttodos de trabalho durante a análise voltamétrica têm uma cinética de transferência de elétrões lenta, sendo necessário um potencial adicional para vencer a barreira da energia de ativação e manter a reação a uma dada velocidade.

A superfície dos eléttodos de trabalho pode ser modificada de acordo com diferentes técnicas que permitam melhorar as suas propriedades. Um dos métodos utilizado para a incorporação de agente modificador de superfície do eléttodo é revesti-la com um filme polimérico adequado.[22] A modificação da superfície com nanomateriais (nanotubos de carbono, nanoprtículas de ouro,...) é outra estratégia simples e eficiente em que a sensibilidade e a seletividade são significativamente superiores que as obtidas com eléttodos convencionais. Além da obtenção de sensores eletroanalíticos mais seletivos e sensíveis, os eléttodos modificados possibilitam a utilização de reagentes imobilizados, o que contribuiu para minimizar a quantidade de reagente necessária, o que por sua vez se traduz numa redução de custos.

O processo de adsorção foi pioneiro e é a forma mais simples de fixar um modificador ao substrato do eléttodo. Consiste na dissolução do agente modificador num solvente apropriado, e na exposição, em geral por imersão, do eléttodo a esta solução. A mesma

solução pode ser disposta, por exemplo com o auxílio de uma micro-pipeta, sobre a superfície a ser modificada, com posterior evaporação do solvente. Outro processo é a formação de compósitos. Um compósito é uma mistura de componentes, que é obtida simplesmente ao misturar o agente modificador com o substrato do eletrodo. Esta técnica é adequada para modificar eletrodos à base de carbono em pó como grafite, eletrodos de pasta de carbono, “screen-printed” e pastilhas. Após a evaporação do solvente as partículas de carbono ficam recobertas pelo modificador, resultando na sua distribuição mais homogênea. A formação de ligações covalentes onde o modificador pode também ser ligado covalentemente ao substrato do eletrodo é outro dos processos existentes. A maioria dos eletrodos metálicos, quando oxidados em meio ácido, são recobertos com uma camada fina de óxido. Após ser oxidado, um metal pode reagir com outra molécula, contendo o grupo funcional que se queira imobilizar. Os procedimentos acima referidos permitem, portanto, a melhoria na capacidade de reconhecimento do analito e da amplificação de sinais de corrente tornando as determinações mais seletivas pelo efeito electrocatalítico [23]. É frequente a modificação com agentes biológicos (enzimas, anticorpos) e químicos (polímeros molecularmente impressos) que permitam obter seletividade para uma dada molécula alvo.

1.7. Polímeros Molecularmente Impressos

A tecnologia de impressão molecular (MIT) é hoje uma abordagem sintética viável de reconhecimento molecular, capaz de imitar as entidades de reconhecimento naturais, tais como anticorpos e recetores biológicos, moléculas biológicas e químicas, incluindo aminoácidos e proteínas, derivados de nucleótidos, poluentes, drogas e alimentos. A conceção de materiais sintéticos, que são capazes de imitar os processos de reconhecimento encontrados na natureza, tornou-se, nos últimos anos, uma área importante na investigação, surgindo deste modo, os polímeros molecularmente impressos (MIP).

Os MIP são matrizes poliméricas tridimensionais com cavidades específicas em tamanho, forma e estrutura para determinadas moléculas. O aumento significativo de utilização dos MIP resulta de um conjunto de vantagens que promovem a sua fiável utilização. [24] Entre as principais destaca-se a alta afinidade e seletividade para moléculas alvo, uma

maior robustez e resistência a elevadas temperaturas. Do ponto de vista económico e de durabilidade são dispositivos de baixo custo e com longos tempos de vida.

Na obtenção de um MIP são essenciais o molde ou analito, os monómeros funcionais, os agentes de ligação cruzada ou “cross-linking”, o iniciador e o solvente. O molde é responsável pela definição da organização espacial dos grupos funcionais dos monómeros. Os monómeros funcionais, por sua vez, são responsáveis pelas interações que se estabelecem nos locais de reconhecimento. São exemplos de monómeros funcionais mais utilizados os ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, bases heteroaromáticas. Os agentes de ligação cruzada desempenham três funções principais: o controlo da morfologia da matriz polimérica, a estabilização dos locais de ligação com capacidade de reconhecimento molecular e a estabilização mecânica da matriz polimérica. A função do iniciador é criar radicais livres para possibilitar o início e a manutenção da reação de polimerização. [25] O solvente serve para juntar todos os componentes na polimerização e é responsável pela criação de poros em polímeros macroporosos. Os solventes mais usados para a síntese de MIP são o tolueno, clorofórmio, diclorometano e acetonitrilo.

1.7.1. Processo de polimerização

O processo de polimerização (Figura 1.11) começa com a dissolução do molde ou analito, a seleção dos monómeros funcionais complementares aos do mesmo analito que formam o complexo molde-monómeros através de interações covalente ou não covalentes, agentes de ligação cruzada e o iniciador radicalar. O polímero obtido é uma matriz macroporosa possuindo microporos com uma estrutura tridimensional complementar à do molde. Assim, a remoção das moléculas do molde a partir do polímero, por lavagem com solvente, deixa locais que são complementares ao molde de ligação. Por conseguinte, o polímero resultante reconhece e liga-se seletivamente às moléculas do molde.

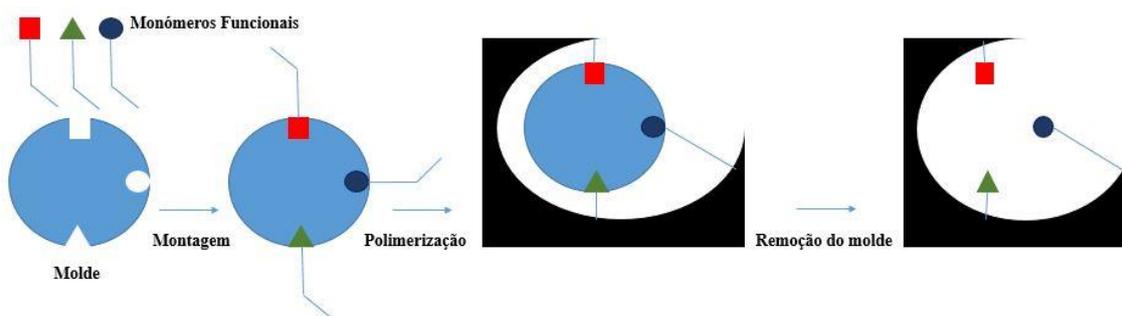


Figura: 1.11 - Representação genérica do processo de polimerização.

A seleção dos monómeros desempenha um papel importante sobre as propriedades finais do polímero. Deve ser capaz de interagir com o molde através de interações covalentes ou não covalentes. Trata-se de uma escolha que requer cuidado uma vez que a formação de um complexo molde-monómero estável é fundamental para o sucesso do reconhecimento molecular.

A natureza e volume do solvente também desempenha um papel importante no processo de impressão molecular. Deve produzir poros suficientemente grandes para assegurar um bom fluxo através das propriedades do MIP resultante. [26] O volume do solvente é diretamente proporcional ao volume de poros do polímero.

1.7.2. Tipo de ligações para preparação de um MIP

Os MIP podem ser sintetizados através de diferentes ligações na impressão molecular entre os monómeros funcionais e o molde. A síntese a partir de radicais livres, é a mais utilizada. Neste sentido, há duas principais abordagens: a covalente e a não covalente:

- **Ligações não-covalente:** Nesta abordagem ocorrem ligações covalentes reversíveis entre o molde e os monómeros funcionais. A extração do molde ocorre pela clivagem das ligações correspondentes. A forte ligação entre o molde e os monómeros funcionais é a principal vantagem desta forma de síntese, o que garante uma maior seletividade ao material porém, dificulta o processo de eluição dos analitos, sendo por vezes necessário, procedimentos drásticos de hidrólise. Este procedimento permite uma maior homogeneidade dos locais de ligação e permite uma maior variedade de condições de polimerização. A qualidade de impressão é maior, no entanto os processos de ligação

e remoção são lentos. Outra desvantagem é o facto de existirem poucas ligações covalentes reversíveis disponíveis para utilização nestes sistemas.

- **Ligações covalente:** Este procedimento é o mais utilizado por ser caracterizado por processos de ligações rápidos e uma maior facilidade de remoção do molde. A síntese não covalente ocorre a partir da formação de interações relativamente fracas entre o molde e os monómeros funcionais. Ela oferece a possibilidade de aplicação para analitos que pertençam a uma mesma classe e, devido à facilidade de eluição dos compostos de interesse, tem sido extensamente utilizada para a preparação de amostras. Como principais desvantagens trata-se de um método que origina uma maior heterogeneidade de locais de ligação e um maior cuidado nas condições de polimerização. Os locais de ligação obtidos por impressão molecular apresentam características diferentes, dependendo das interações estabelecidas durante a polimerização. [26] Verifica-se uma menor afinidade nos locais de ligação utilizando ligações não covalentes devido a presença de forças eletrostáticas, pontes de hidrogénio e forças de Van der Waals entre o molde e os monómeros funcionais.

1.7.3. Técnicas de polimerização

A polimerização em massa (bulk) é o procedimento mais comum para a obtenção de microesferas impressas. Neste procedimento, o molde, os monómeros, o cross-linking e o iniciador são dissolvidos inicialmente no solvente. A reação ocorre na ausência de oxigénio sob fluxo de N_2 ou ar e é induzida com aquecimento e/ou radiação UV. O oxigénio deve ser eliminado do meio reacional, pois retarda a reação de polimerização radicalar. [30] Por fim, obtém-se um monólito (compósito) submetido a processos mecânicos e submetido a uma lavagem com solvente para extração do analito, resultando em partículas irregulares, com diâmetro entre 10 e 25 μm . No entanto, apesar da simplicidade e fiabilidade desta técnica, a irregularidade da forma das partículas e a elevada quantidade de resíduos produzidos são desvantagens significativas associadas à técnica quando utilizada para grandes quantidades.

Como alternativa à polimerização em massa (bulk), novos procedimentos têm sido propostos para um melhor controlo do tamanho e porosidade das partículas. Na

polimerização por suspensão, o fenômeno ocorre dentro das gotas dos monómeros funcionais dispersos num solvente imiscível, geralmente água. O polímero obtido no formato de esferas é facilmente separado da fase aquosa. A primeira etapa da síntese destes polímeros consiste em solubilizar todos os constituintes num solvente orgânico apolar. Posteriormente, o mesmo solvente é adicionado a água contendo um agente estabilizador, cuja função é evitar a coagulação das gotas dos monómeros funcionais durante o processo. A reação de polimerização ocorre após o aquecimento sob agitação, onde resultam partículas com tamanhos uniformes. A polimerização por suspensão tem maior taxa de sucesso quando os moldes e monómeros funcionais interagem preferencialmente por interações hidrofóbicas e iônicas.

A polimerização por precipitação é similar ao método de polimerização em "bulk". A principal diferença entre estes dois métodos são os volumes de solventes utilizados. Neste método de polimerização por precipitação são usadas quantidades cerca de cinco vezes maiores de solvente. De forma convencional, a formação de partículas a partir do método de polimerização por precipitação ocorre devido ao crescimento da cadeia polimérica ao longo da reação, o que torna o polímero cada vez menos solúvel no meio. Tal como a polimerização por suspensão, a polimerização por precipitação produz partículas com tamanhos uniformes com diâmetros inferiores a 1 μm . [29, 30] Outro ponto que deve ser destacado refere-se ao maior rendimento da reação. Neste método as micropartículas são obtidas por meio de centrifugação.

1.7.4. MIP eletroquímicos

Devido às suas propriedades e vantagens, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem sido alvo de investigação e inovação, nomeadamente no estudo de novos elementos seletivos. Assim, o uso de MIPs como elemento de seletividade para sensores eletroquímicos tem-se mostrado muito promissor. A principal dificuldade na preparação deste tipo de sistema consiste na integração do MIP com o transdutor, isto é, conseguir incorporar num eléctrodo de trabalho o polímero obtido, garantindo estabilidade e reprodutibilidade do processo.

Para isso têm sido testadas várias técnicas como: deposição de gota; *spin-coating*, deposição camada por camada (*layer by layer*), *grafting*, eléctropolimerização, preparação

de polímeros em nanopartículas. Entre essas técnicas, a eletropolimerização tem-se revelado a mais eficiente pois permite preparar filmes poliméricos molecularmente impressos à superfície do transdutor com simplicidade e rapidez de preparação e permite de igual modo controlar com facilidade a espessura do filme e sua morfologia. Controlando as condições eletroquímicas, nomeadamente o número de ciclos, a gama de potencial e a velocidade de varrimento é possível controlar com grande eficácia as propriedades do filme polimérico preparado. Uma vantagem desta técnica é o facto de dispensar, na sua maioria, a utilização do iniciador e de agentes *cross-linking*. É possível a preparação de polímeros condutores ou não condutores, dependendo do monómero usado, sendo frequente a incorporação de nano materiais, como os nano tubos de carbono, no sentido de melhorar a condutividade e/ou a área de superfície de trabalho. [27, 28] Como exemplos de monómeros regularmente usados temos: pirrol, o-fenilenodiamina, fenol e derivados, tiofeno e derivados.

1.7.5. Aplicações dos MIP

A tecnologia de impressão molecular tem sido amplamente utilizada em diversas áreas, tais como ambiente, biotecnologia, clínica, alimentação sendo a de maior destaque a área da química analítica, principalmente na separação e concentração de vários analitos em diferentes amostras.

Vários trabalhos têm demonstrado a aplicabilidade dos MIP em técnicas de cromatografia e de extração em fase sólida. De facto um grande número de trabalhos tem sido feito no desenvolvimento de MIPs nesta área de separação. [32, 33]

Na área dos sensores, os MIP tem apresentado elevado potencial como recetores biomiméticos e como sensores químicos, em particular biossensores. O primeiro sensor biomimético utilizando o MIP como elemento de reconhecimento foi um sensor de capacitância contendo uma fina membrana polimérica impressa com anilina de fenilalanina, na qual a ligação deste analito resultava numa mudança na capacitância do sistema, permitindo a deteção qualitativa do mesmo. Posteriormente a aplicação dos MIP englobou o desenvolvimento de sensores químicos dentre os quais destacam-se: os eletroquímicos, os piezométricos e os óticos que com o aparecimento da fibra ótica, ganharam outra relevância. [18]

No domínio da farmacologia, a utilização dos MIP como “drug delivery systems” DDS, ainda se encontra em fase inicial de desenvolvimento. “O emprego de MIP em humanos requer a avaliação de diferentes parâmetros de risco inerentes à toxicidade dos polímeros, dos reagentes remanescentes da síntese e de seus produtos de degradação”. Alguns desses produtos resultantes podem causar sérios danos celulares, sendo imperativo desenvolver estratégias eficientes de lavagem dos polímeros até a obtenção de níveis de solventes considerados não tóxicos. A utilização de MIP em DDS é justificada pelo seu potencial como sistemas inteligentes de libertação de fármacos. Esses sistemas permitem o início ou a variação da velocidade de libertação do fármaco em resposta a mudanças no ambiente no qual se encontra bem como a mudanças na estrutura tridimensional do polímero, originando uma mudança estereoquímica da estrutura polimérica. [18] Contudo, e apesar da aplicação dos MIP em dispositivos DDS ainda se restringir a poucos trabalhos, evidencia-se um futuro promissor destas aplicações.

1.8. Motivação e Objetivos

Decorria o 2º ano de licenciatura quando tive o primeiro contacto com sensores elétricos. Cedo me apercebi da curiosidade suscitada por esses dispositivos e que, juntamente com o gosto pelo trabalho de investigação nos laboratórios de química, igualmente desenvolvido nesse mesmo ano, me fizeram optar por aceitar este desafio. Outra motivação foi a possibilidade de obter conhecimentos numa área diferente daquela que me formei, para adquirir alguma polivalência.

Os objetivos propostos para este trabalho consistem na criação e desenvolvimento de um sensor eletroquímico, um MIP, capaz de detetar a presença de naloxona NLX, um antagonista de opioídes. Numa primeira fase o objetivo consistiu em otimizar as características do MIP e numa segunda fase, aplicar o sensor na análise de NLX em amostras de soro humano.

1.9. Organização do relatório

O presente documento está dividido em 7 capítulos com seus subcapítulos. O capítulo 1 é a Introdução ao tema onde se abordam os fármacos, em especial os opióides e a Naloxona, objetivo principal do trabalho. Não menos importante do que os fármacos, aborda-se igualmente os sensores e em particular os sensores eletroquímicos, bem como as técnicas voltamétricas utilizadas na obtenção dos sinais analíticos. Por fim, aborda-se as técnicas de polimerização, assim como os polímeros molecularmente impressos, os MIP.

O capítulo termina com a motivação, os objetivos propostos para o presente trabalho e a estrutura do relatório.

O capítulo 2 corresponde aos materiais e métodos.

No capítulo 3 e subcapítulos apresentam-se os resultados obtidos e a discussão dos mesmos e ainda a aplicação do sensor a amostras biológicas.

Por fim, no capítulo 4 encontram-se as conclusões gerais do trabalho desenvolvido.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes

Na realização do presente trabalho experimental, foram utilizados os seguintes reagentes, sem qualquer modificação adicional: Naloxone hydrochloride dihydrate (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$), ácido 4-Amino-benzoico (Sigma-Aldrich, 99%), metanol 99.8% (Prolabo); dihidrogenofosfato de potássio (Riedel-de Haën); hidrogenofosfato de dipotássio (Riedel-de Haën), ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, 37%), ácido sulfúrico (Panreac, 96%), nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com $-\text{COOH}$ (Dropsens), dimetilformamida (Sigma-Aldrich, 99%), Soro humano (Sigma-Aldrich, obtido de sangue AB masculino)

2.2. Soluções

Foram preparadas soluções de tampão fosfato com concentração de 0,1 M, pH 7, misturando as quantidades apropriadas de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 e acertando o pH com NaOH 1 M até ao valor desejado. As polimerizações foram realizadas utilizando soluções dos respectivos polímeros com diferentes concentrações, preparadas em 0,1M de tampão fosfato pH 7.

Foi preparada uma solução mãe de NLX 50 mM em água e mantida no frigorífico a 4°C . A partir desta solução foram preparadas diariamente soluções de trabalho de diferentes concentrações em tampão fosfato e mantidas no frigorífico a 4°C durante o máximo de três dias. Foram preparadas soluções aquosas de ácido sulfúrico de concentração 0,5 M. Foi preparada um solução de extração de metanol/ HCl 0,1M (50:50) para a realização das extrações.

Foi preparada uma solução de nanotubos (num tubo eppendorf de 1mL) de concentração 1mg/mL em água:DMF (50:50). A solução foi colocada em ultra-sons durante 4h para obtenção de uma boa dispersão.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada (resistividade = $18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtida a partir de um sistema de ultra purificação de água Millipore (Simplicity 185).

2.3. Equipamento

Utilizaram-se elétrodos comerciais serigrafados (*screen-printed*) (DropSens, DRP-110) como elétrodos de trabalho ($d = 4 \text{ mm}$) e auxiliar de carbono e um eletrodo de referência de prata (SPCE). Estes elétrodos foram posteriormente modificados para a construção dos sensores seletivos. O equipamento utilizado para as medições eletroquímicas foi um potenciostato/galvanostato da marca Metrohm Autolab, modelo PGSTAT 204 controlado pelo sistema de aquisição e tratamento de dados NOVA (versão 1.10). Os elétrodos serigrafados foram ligados aos potenciostatos através de um conector da DropSens(DRP-CAC).

Na preparação das soluções líquidas utilizou-se material de vidro comum de laboratório bem como micropipetas (VWR) de $10 \mu\text{L}$, $20 \mu\text{L}$, $200 \mu\text{L}$ e $1000 \mu\text{L}$.

Todas as pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo, MS205DU), com precisão de $0,00001 \text{ g}$ e numa balança analítica (Kern, EW220-3nm), com precisão de $0,001 \text{ g}$.

Para uma melhor dissolução de sólidos na preparação de soluções foi usado um sistema de Ultrassons Sonorex Digital 10P (Bandelin).

Recorreu-se a um sistema de purificação de água modelo Elix da Millipore, para a obtenção de água pura e o sistema de ultrapurificação de água Millipore Simplicity 185.

O trabalho experimental foi realizado, na sua totalidade, à temperatura ambiente.

2.4. Preparação do sensor

Previamente à sua utilização, os SPCE foram lavados com água ultrapura e secos com auxílio de um fluxo de azoto. Após a lavagem procedeu-se à ativação da superfície do eletrodo de trabalho, colocando uma gota de $40 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 $0,5 \text{ M}$, e procedendo a um varrimento por voltametria cíclica (CV) durante 5 ciclos com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s num intervalo de potencial entre $-0,2$ e $+1,3 \text{ V}$. De seguida preparou-se o sensor de acordo com o esquema representado na Figura 4.1. Colocou-se $4 \mu\text{L}$ de uma solução de nanotubos de carbono (MWCNT) 1 mg/mL em água/DMF (50:50), e deixou-se secar durante cerca de 20 minutos com auxílio de um lâmpada de infravermelho. Após a secagem do filme MWCNT, procedeu-se a electropolimerização por CV numa gama entre $-0,2$ e $1,0 \text{ V}$, com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s

durante 20 ciclos, a partir de uma solução contendo 40 mM de 4 – ABA e 0,5 mM de NLX em tampão fosfato 0,1 M pH 7. Para finalizar, é necessário remover o molde (NLX) da matriz polimérica, de modo a obter um polímero com as cavidades específicas para a nossa molécula. Para isso recorreu-se a extração por solvente usando uma solução de metanol /HCl 0,1 M (50:50). O procedimento de extração foi realizado colocando 40 μ L da solução no SPCE, sendo essa solução sucessivamente renovada a cada 10 minutos durante 1 hora.

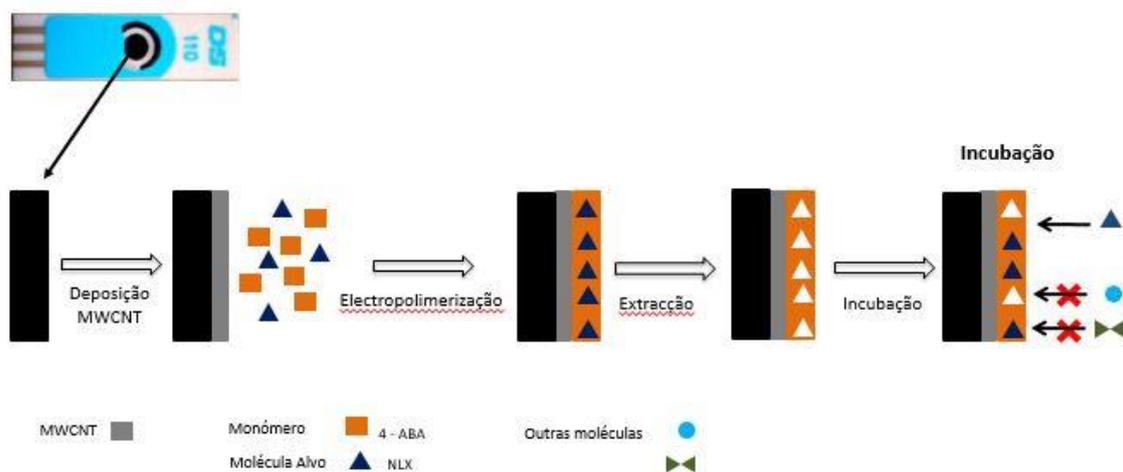


Figura: 1.12 - Esquema de preparação e funcionamento do sensor

2.5. Medições eletroquímicas

O funcionamento do sensor MIP para a deteção de NLX obedece a 3 etapas

- 1) Incubação: colocação no MIP-SPCE de 10 μ L de soluções ou amostras contendo NLX durante 10 minutos.
- 2) Medição voltamétrica: após incubação o sensor é lavado abundantemente com água ultrapura e seco. Depois são colocados 10 μ L de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7 procedendo-se à oxidação das moléculas de NLX por voltametria diferencial por impulsos, com uma amplitude de 50 mV, um salto de potencial de 5 mV numa gama de potenciais entre 0,15 e 0,5 V.
- 3) Extração: Após análise é necessária a remoção das moléculas de NLX do sensor antes de se poder prosseguir para outra análise. Este procedimento foi realizado

colocando sucessivamente 40 μL solução 50:50 de metanol/HCl 0,1 M durante 30 minutos.

2.6. Preparação de amostras

Foram utilizadas amostras de soro humano para testar a aplicação do sensor em amostras reais. Estas amostras foram diluídas 50% em tampão fosfato 0,1 M pH 7, não sendo realizado qualquer outro tratamento. Para os ensaios de recuperação as amostras foram dopadas com concentrações de 2 e 8 μM de NLX, respetivamente.

3. Resultados e discussões

3.1. Comportamento eletroquímico da NLX

Inicialmente, procedeu-se ao estudo e comparação do comportamento eletroquímico da NLX, utilizando dois tipos de elétrodos diferentes: um *Screen printed electrode* de carbono (SPCE) e um elétrodo de carbono vítreo (GCE). Para isso foi preparada uma solução de NLX 0,05 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 7 e aplicou-se as técnicas voltamétricas CV e DPV. Os voltamogramas obtidos estão representados na Figura 3.1. Na CV apresentada no gráfico A, verificou-se a formação de dois picos de oxidação num intervalo entre os 0.3 V e 0.8 V, sendo os picos ligeiramente maiores no elétrodo SPCE. Em nenhum dos casos é visível picos de redução, pelo que se trata de um processo irreversível. Os resultados da DPV na Figura 3.1 (B), apresentam picos de oxidação a 0.32 V e 0.62 V no elétrodo SPCE e a 0,53 V e 0,83 V no GCE. A resposta da DPV obtida no elétrodo SPCE foi a melhor, uma vez que se observam picos de oxidação de maior intensidade do que o obtido no elétrodo GCE. Para os testes seguintes escolheu-se o elétrodo SPCE e foi utilizado o pico a 0,32 V para análise da NLX pois apresenta maior intensidade de corrente.

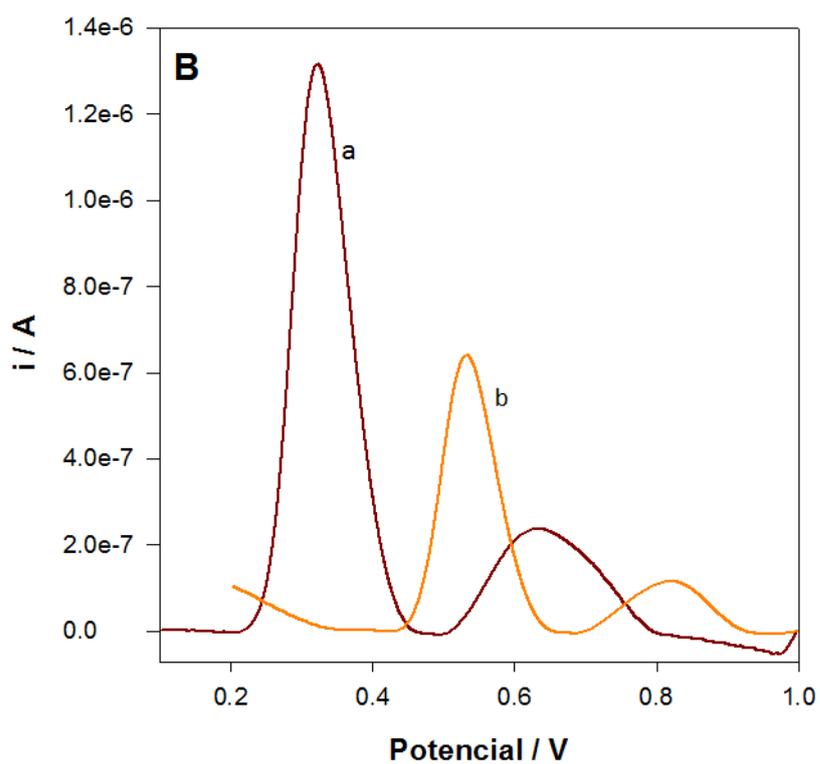
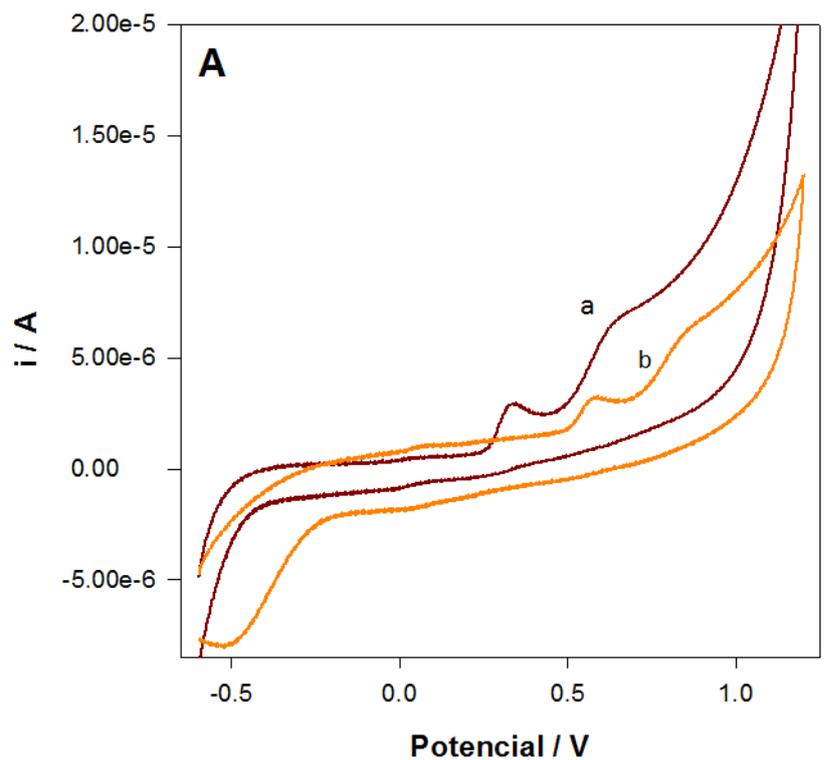


Figura 3.1- Variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de NLX entre 0,25 e 10 μM

3.2. Impressão molecular da NLX

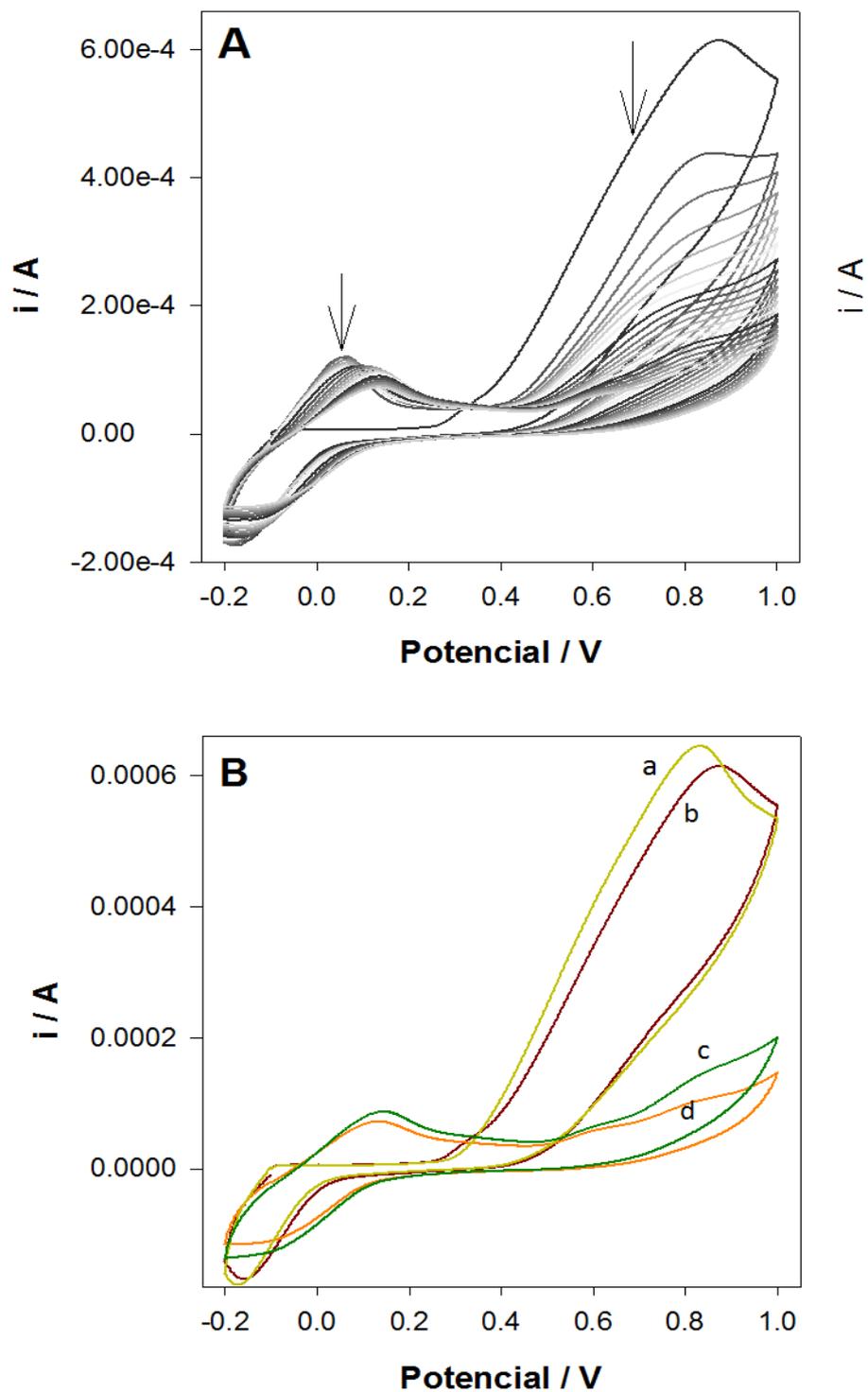


Figura: 3.2 - (A) Eletropolimerização de um MIP a partir de uma solução de 20 mM 4-ABA, 0,5 mM NLX em tampão fosfato 0,1 M pH 7 durante 20 ciclos; (B) 1º ciclo de um NIP (a), 1 ciclo de um MIP (b), ultimo ciclo de NIP (c) e ultimo ciclo de um MIP (d)

De seguida procedeu-se à impressão molecular da NLX. O processo de polimerização adotado neste trabalho foi a electropolimerização diretamente na superfície do eletrodo de trabalho do SPCE. Preparou-se uma solução contendo o monómero (4-ABA) em tampão fosfato juntamente com a NLX e eletropolimerizou-se por CV na gama -0,2 a 1,0 V durante 20 ciclos. Na Figura 3.2 (A) é possível observar o processo de formação do filme polimérico. No 1º ciclo verifica-se a formação de um pico de oxidação de 4-ABA a 0,8 V e um pico de redução a -0,1 V. É possível ainda observar um pequeno pico de oxidação a 0,35 V, correspondente à NLX. A partir do 2º ciclo é visível mais um pico de oxidação do polímero a 0,1 V. Ao longo dos ciclos há uma diminuição dos picos de oxidação e redução do polímero durante a eletropolimerização, comprovando-se que há formação de um filme polimérico na superfície do eletrodo. Preparou-se também um eletrodo não impresso (NIP), usando as mesmas condições mas sem presença de NLX na solução, verificando-se um comportamento similar mas com ligeiras diferenças. Na Figura 3.2 (B) denotam-se ligeiras diferenças na polimerização entre MIP e NIP. Observam-se picos de oxidação do polímero 4 – ABA ligeiramente maiores no NIP tanto no primeiro ciclo da polimerização como no último. Esta ligeira diferença pode dever-se a presença NLX no MIP, bloqueando mais o sinal do polímero. No 1º ciclo do NIP não se observa nenhum pico a 0,35 V que é o pico relativo à NLX. Estes resultados mostram por um lado o sucesso de formação de um filme polimérico e simultaneamente a incorporação da NLX durante a polimerização. Estes resultados foram complementados pela realização de uma medição por DPV em tampão fosfato 0,1 M pH 7 do MIP e NIP logo após polimerização.

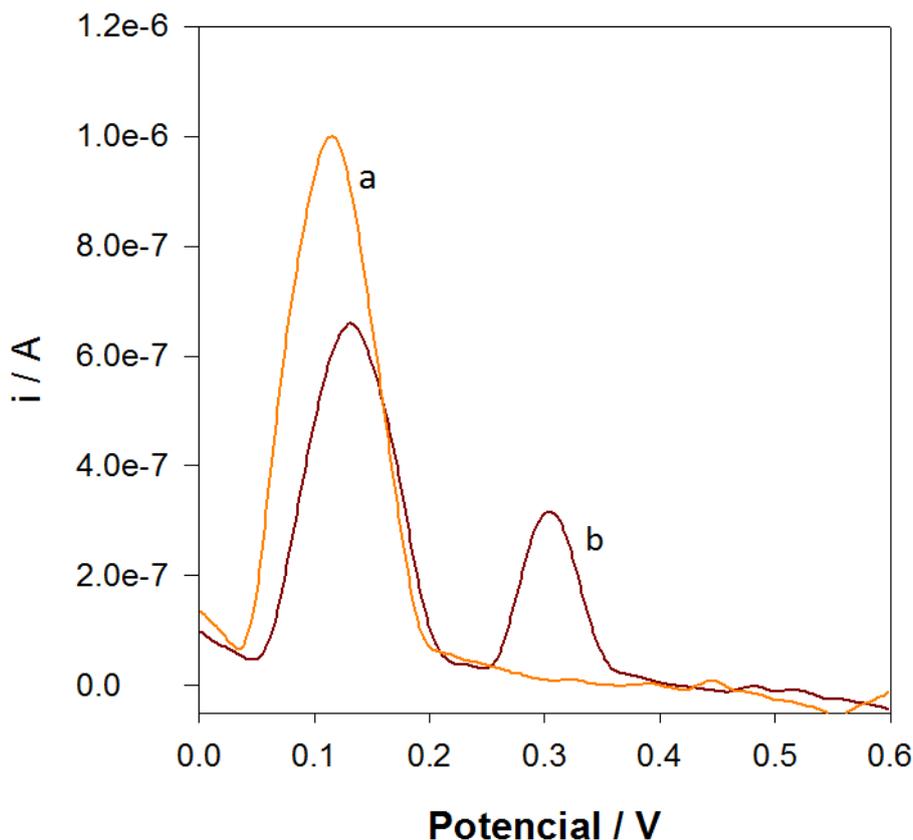


Figura: 3.3 - DPV em tampão fosfato 0,1 M pH 7 de um NIP (a) e MIP (b) após polimerização

Na Figura 3.3 que representa o NIP-SPCE e MIP-SPCE após a polimerização, observam-se os picos de oxidação referentes ao polímero 4-ABA a 0,12 V, sendo o pico do NIP visivelmente superior ao do MIP. Outra diferença bem visível entre eles é a presença de um pico em 0.3 V no MIP relativo a NLX, comprovando a incorporação desta molécula no filme polimérica. Não se observa a presença de um pico no NIP, dada a inexistência de NLX.

3.3. Caracterização morfológica por microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

Após sucesso na impressão da NFX, realizou-se uma caracterização morfológica por SEM da superfície de eléctrodos com diferentes modificações. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.4.

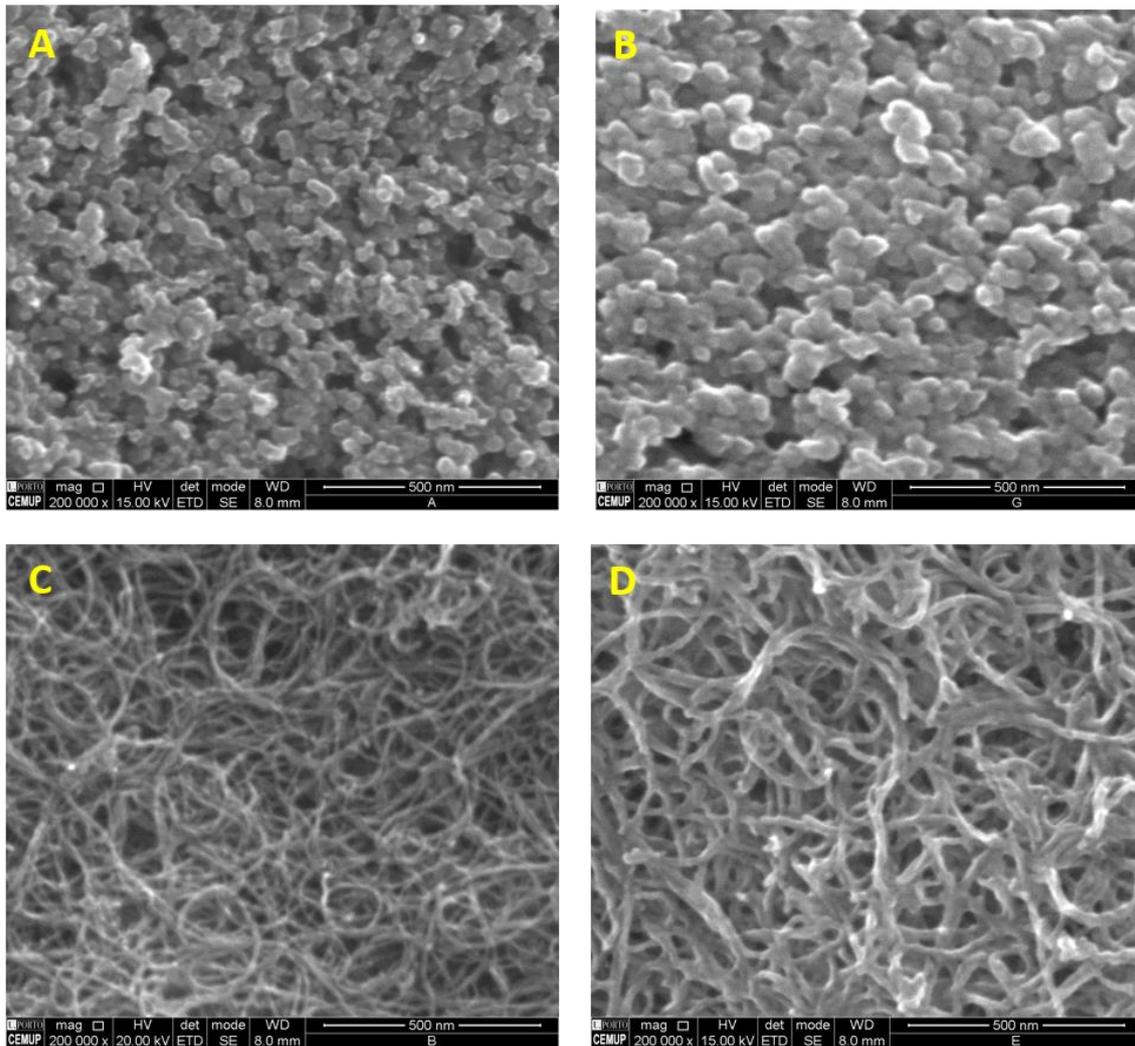


Figura: 3.4 - Imagens SEM de (A) SPCE, (B) MIP/SPCE, (C) MWCNT/SPCE e (D) MIP/MWCNT/SPCE

Estes resultados permitem analisar as diferentes modificações na superfície do SPCE. Quando comparamos o SPCE com o MIP/SPCE observa-se uma ligeira diferença nas estruturas, caracterizada por um “engrossamento” que confirma a formação de um fino filme de polímero. A diferença do SPCE para o MWCNT/SPCE é clara, observando-se o sucesso da deposição dos MWCNT. Finalmente, no MIP/MWCNT/SPCE observa-se um “engrossamento” da estrutura dos MWCNT. Esta diferença é contudo ligeira, facto que mostra que o filme polimérico formado apresenta pouca espessura.

3.4. Comportamento eletroquímico da NLX no MIP/MWCNT/SPCE

Depois de se confirmar por diferentes métodos o sucesso da formação do polímero e incorporação da NLX, procedeu-se ao estudo da capacidade do polímero “reconhecer” a NLX, assim como da importância da modificação prévia com MWCNT.

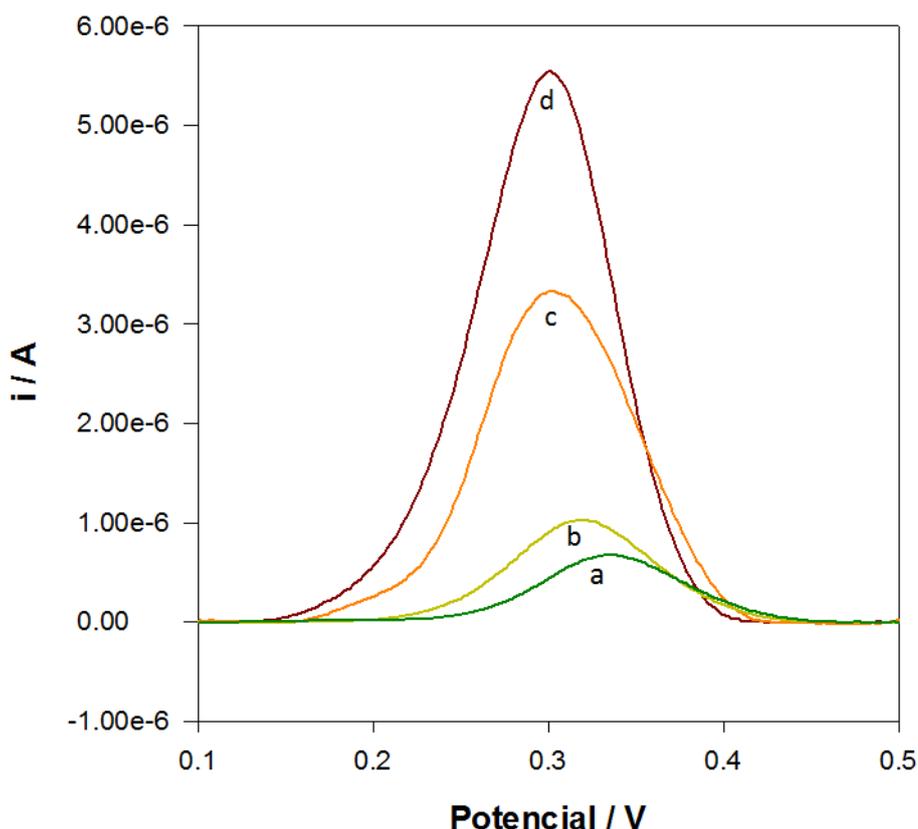


Figura: 3.5 - Voltamogramas correspondentes a oxidação da NLX em diferentes eletrodos: a) NIP/SPCE; b) MIP/SPCE, c) NIP/MWCNT/SPCE e d) MIP/MWCNT/SPCE

Na Figura 3.5 estão representados os picos de oxidação dos NIP e MIP na ausência e presença de nanotubos de carbono (MWCNTs). Observa-se que os picos de oxidação nos MIP são ligeiramente superiores aos NIP, e que essa diferença é ampliada com a presença dos nanotubos. A diferença entre a amplitude dos picos de oxidação nos NIP e MIP deve-se à formação de cavidades seletivas para a NLX nos MIP. O facto de os NIPs apresentarem picos, mostra a capacidade do polímero para se ligar à NLX, ainda que de forma não seletiva neste caso. A diferença de sinal para MIP mostra que para além de poder existir uma interação não seletiva, existe claramente também uma interação seletiva

que será devida à formação de cavidades específicas. Estes resultados indicam um claro sucesso na formação de cavidades, na capacidade para remover o molde e finalmente na capacidade para interação específica com a NLX, caso contrário o sinal do MIP não seria significativamente superior ao NIP. Diferenças claras nos voltamogramas, são também as da influência dos MWCNTs nos diferentes SPCEs. Os picos de oxidação aumentam, respectivamente, cerca de duas vezes entre a ausência e presença dos MWCNT, o que leva a concluir que os MWCNTs melhoram bastante a condutividade elétrica na superfície dos SPCEs aumentando a área superficial. Verifica-se um ligeiro desvio para potenciais mais baixos dos picos de oxidação na presença de MWCNT, podendo afirmar-se que estes nanomateriais facilitam a oxidação da NLX. Foi possível modificar com sucesso os SPCEs com MWCNT, assim como preparar um filme na superfície destes nanomateriais, melhorando significativamente a resposta analítica e garantindo a seletividade do MIP. De seguida estudou-se a influência da concentração de MWCNT depositados nos SPCE, na resposta analítica, assim como a influência do pH do eletrólito de suporte usado na medição do sinal.

3.4.1 Otimização da concentração dos MWCNTs

Foram preparadas soluções de MWCNT de diferentes concentrações e depositadas em diferentes SPCE, de acordo com o descrito anteriormente. Para cada SPCE com diferente concentração foram preparados MIP/MWCNT/SPCE e foi estudada a sua resposta à interação com NLX. Os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.6.

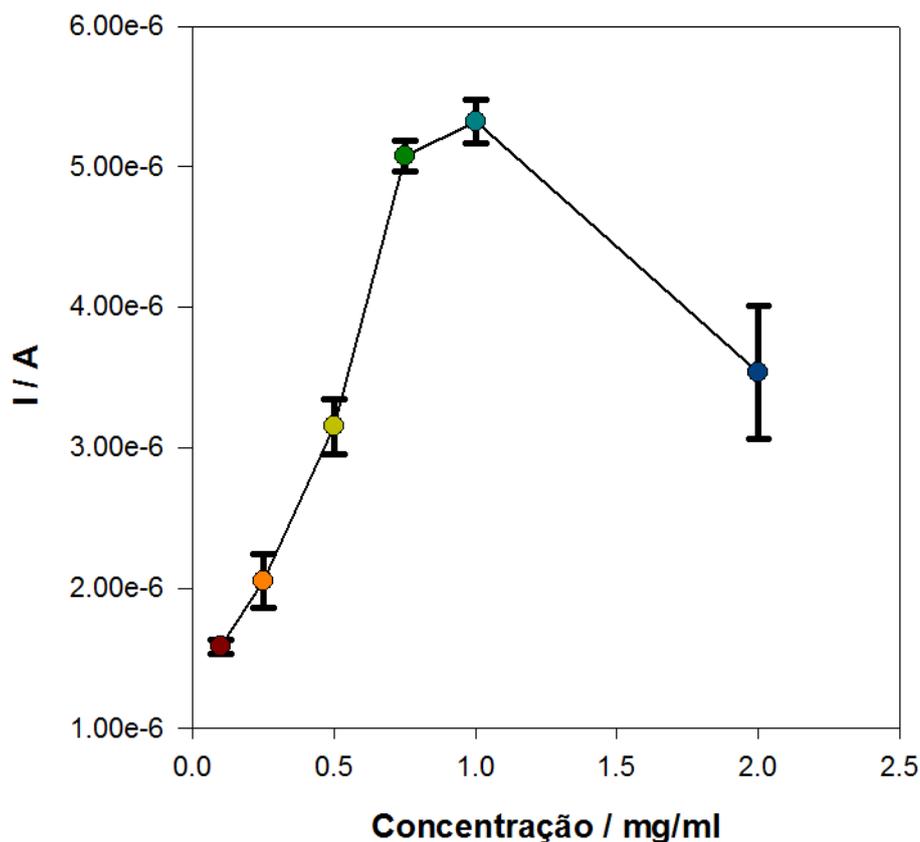


Figura: 3.6 - Variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de MWCNT colocados no SPCE

Na Figura 3.6 observa-se o comportamento da intensidade de corrente de pico em função da concentração de MWCNT no SPCE. Verifica-se um aumento muito grande das correntes de pico nas quatro primeiras concentrações, havendo um ligeiro aumento do quarto para o quinto pico correspondente a uma concentração de 1 mg/mL. Para valores posteriores a essa concentração, verificou-se um decréscimo do pico para uma concentração de 2 mg/mL. Estes resultados mostram que há claras diferenças na intensidade de corrente em função da concentração de MWCNT. Há aumento significativo até se atingir o máximo para uma concentração de 1mg/mL. Para concentrações maiores o sinal baixa, pelo que se pode concluir que o excesso de camadas de MWCNT pode tornar-se negativo. Para este trabalho foi escolhida a concentração referente ao maior valor de corrente de pico, ou seja 1 mg/mL.

3.4.2. Otimização da concentração do pH de medição

Foram preparadas soluções tampão de diferentes pH numa gama entre 2 e 9 e foi analisada a resposta analítica da NLX no MIP/MWCNT/SPCE para diferentes valores de pH. Na Figura 3.7 estão expressos os resultados obtidos.

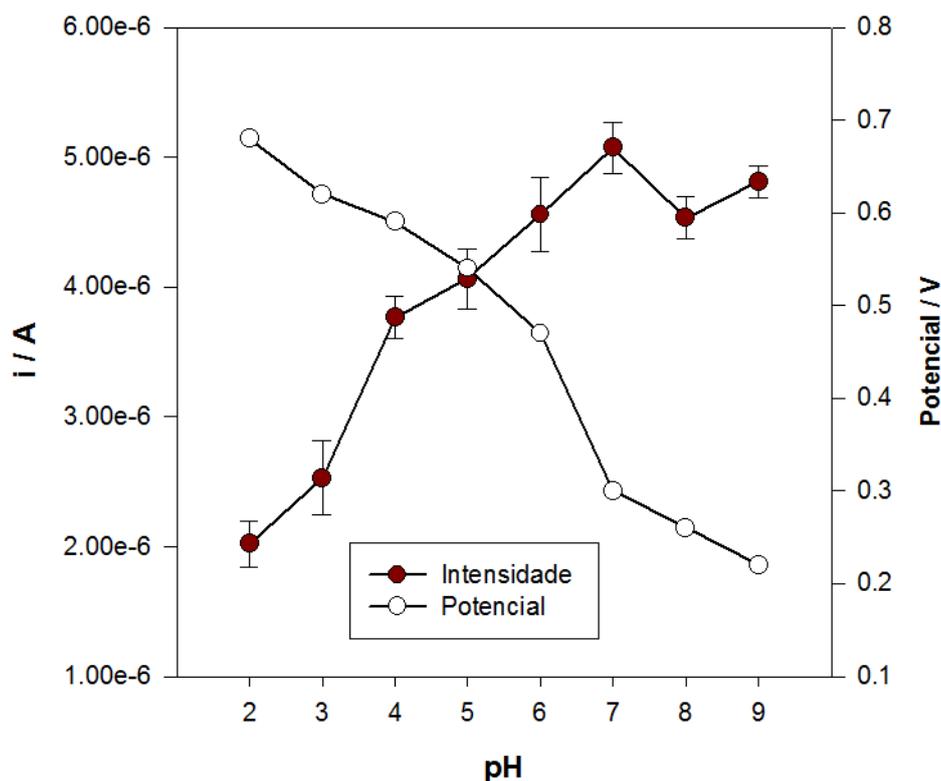


Figura: 3.7 - Variação da intensidade e potencial do pico em função do pH da solução de medição

Na Figura: 3.7 observa-se as variações da intensidade de corrente e potencial de pico em função da variação do pH da solução de medição. A intensidade e o potencial têm comportamentos inversos à medida que aumenta o pH. Observa-se um aumento da intensidade de corrente até o valor de pH 7 que corresponde ao valor onde se verifica a maior intensidade de pico de corrente, sendo por esse motivo, o valor do pH escolhido para a solução de medição. Há uma clara diferença de intensidade de pico para valores mais ácidos, onde a intensidade de corrente é bastante menor. Em relação ao potencial, observa-se um deslocamento do potencial para valores mais baixos à medida que aumenta o pH. Na gama entre 2 e 6 a variação do potencial é quase linear. No entanto há uma

alteração de potencial quando se passa de um valor de pH 6 para 7. A variação volta a ser linear na gama 7 a 9.

3.5. Otimização das condições de polimerização e funcionamento do MIP

Foram realizados vários estudos de otimização da preparação do MIP. As otimizações realizadas englobaram a concentração do polímero 4-ABA, a concentração da NLX, o número de ciclos de polimerização, as condições de incubação e extração. Na totalidade dos testes das diferentes otimizações acima referidas, utilizaram-se diferentes concentrações de polímero a-ABA e NLX, diferentes números de ciclos e diferentes tempos de incubação. No processo de extração, além de utilizar vários tempos diferentes, foram testados vários solventes de extração. Estes estudos tiveram como propósito obter as condições mais adequadas para a obtenção de um MIP com as melhores características possíveis.

3.5.1 Otimização da concentração de 4-ABA

Foram preparados diferentes MIP/MWCNT/SPCE partido de diferentes concentração de monómero na solução de polimerização, entre 0.5 e 20 mM. Para estes ensaios foi usada uma solução de NLX de 0,1 mM e as polimerizações decorreram durante 20 ciclos. Os resultados obtidos estão expressos na Figura 3.8.

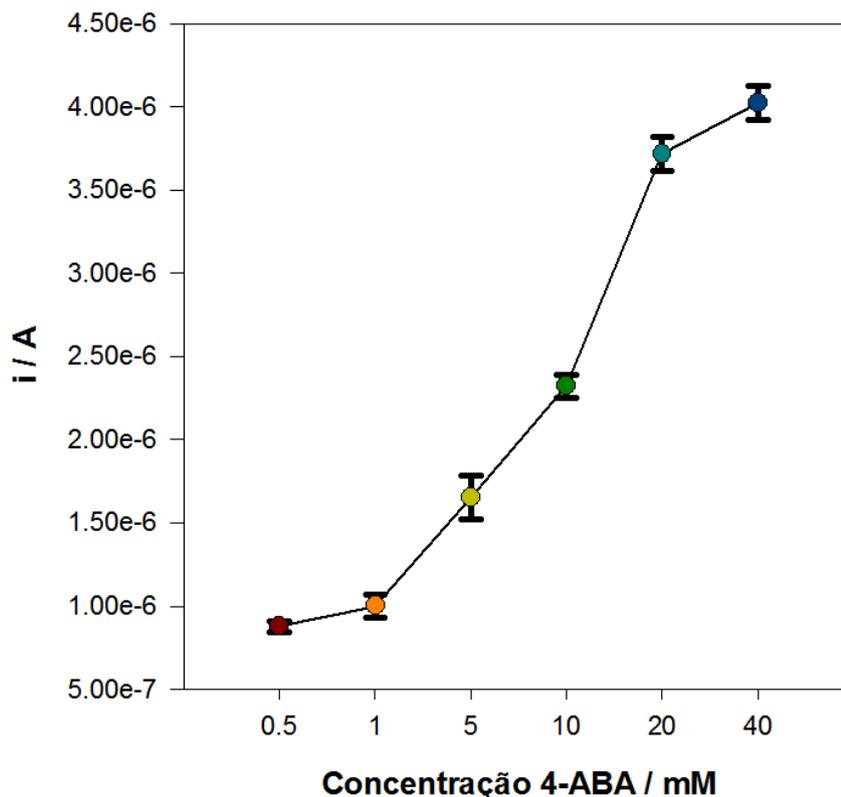


Figura: 3.8 - Variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de polímero (4-ABA) usado durante a polimerização

A Figura: 3.8 representa a variação da intensidade de corrente do pico de oxidação de NLX em função da concentração de 4-ABA durante a eletropolimerização. É visível o aumento do valor do pico da corrente em função do aumento da concentração do polímero. Verifica-se um comportamento semelhante a um crescimento linear, havendo um aumento mais significativo entre os 10 mM e 20 mM, onde a corrente oscila aproximadamente de 2.25 μ A para 3.75 μ A. Entre os 20 e os 40 mM o aumento é mais modesto. Verifica-se que na gama de concentrações testada, a concentração de 4-ABA usada na polimerização tem uma grande influência na resposta final. Entre a concentração mais baixa e a mais alta há uma diferença de cerca de 4 vezes do sinal. Isto acontece, por um lado pela capacidade de formar mais polímero e logo mais cavidades para NLX, mas também porque há a formação de um polímero condutor, pelo que a resposta aumenta com a concentração. A concentração escolhida foi de 40 mM, uma vez que se obteve um pico de intensidade de corrente mais elevada com essa concentração de monómero.

3.5.2. Otimização da concentração de NLX

Seguidamente estudou-se a variação da concentração de NLX na solução de polimerização, numa gama entre 0.1 e 10 mM. Para estes estudos foram preparados diferentes MIP/MWCNT/SPCE usando 40 mM de 4-ABA, polimerizando durante 20 ciclos e variando a concentração de NLX. Na Figura 3.9 estão representados os resultados obtidos.

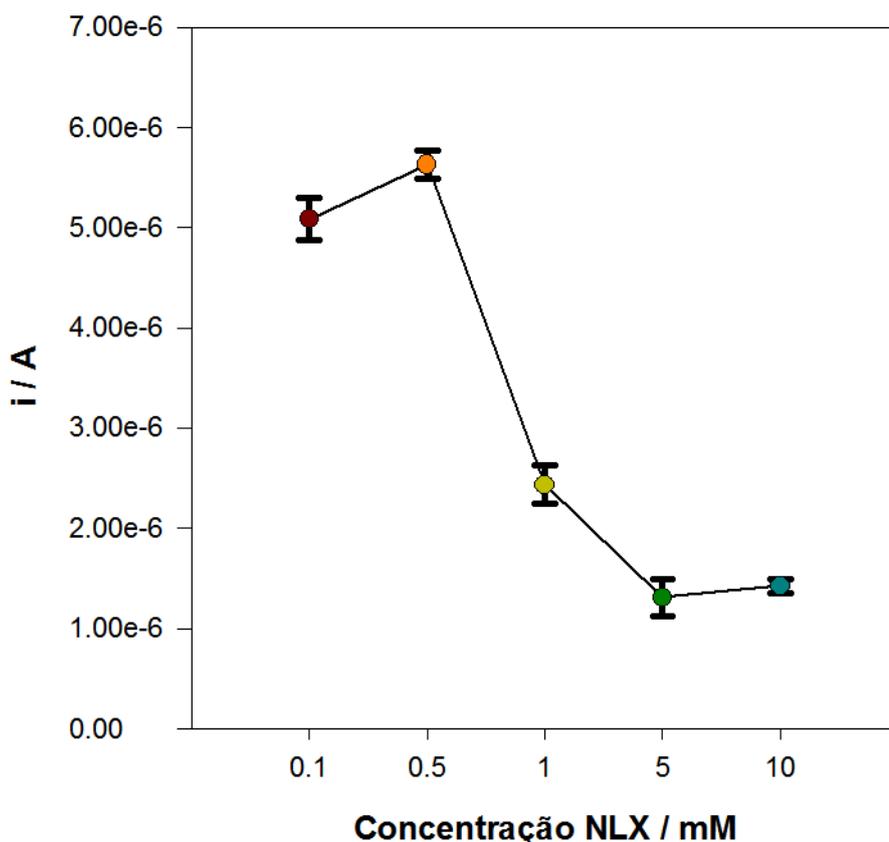


Figura: 3.9 - Variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de NLX usado durante a polimerização

Na figura 3.9 observa-se o comportamento da intensidade corrente de pico de NLX em função das diferentes concentrações de NLX usadas durante a polimerização. Não se visualizou um comportamento semelhante a um comportamento linear, havendo um aumento ligeiro do pico de corrente de 0.1 mM para 0.5 mM e de seguida um decréscimo para concentrações de 1 mM e 5 mM, e estabilizando entre 5 e 10 mM. Trabalhou-se com uma concentração de 0.5 mM por se observar o maior pico de corrente com essa concentração de NLX. Estes resultados mostram a otimização da relação entre monómero

e molécula alvo. O facto de haver um grande decréscimo de sinal para concentrações mais altas pode estar relacionado com a incorporação de um excesso de moléculas de NLX, que torna difícil a sua posterior remoção completa e formação de cavidades.

3.5.3. Otimização do número de ciclos de polimerização

Quando se prepara um MIP por electropolimerização por CV, um parâmetro fundamental a estudar é o número de ciclos de varrimento. Este parâmetro permite um grande controlo sobre a espessura do filme polimérico obtido na superfície do eléctrodo. Deste modo, usando as condições otimizadas anteriormente, foram preparados diferentes MIP/MWCNT/SPCE usando diferentes números de ciclos de varrimento. A resposta destes diferentes sensores foi analisada (Figura 3.10).

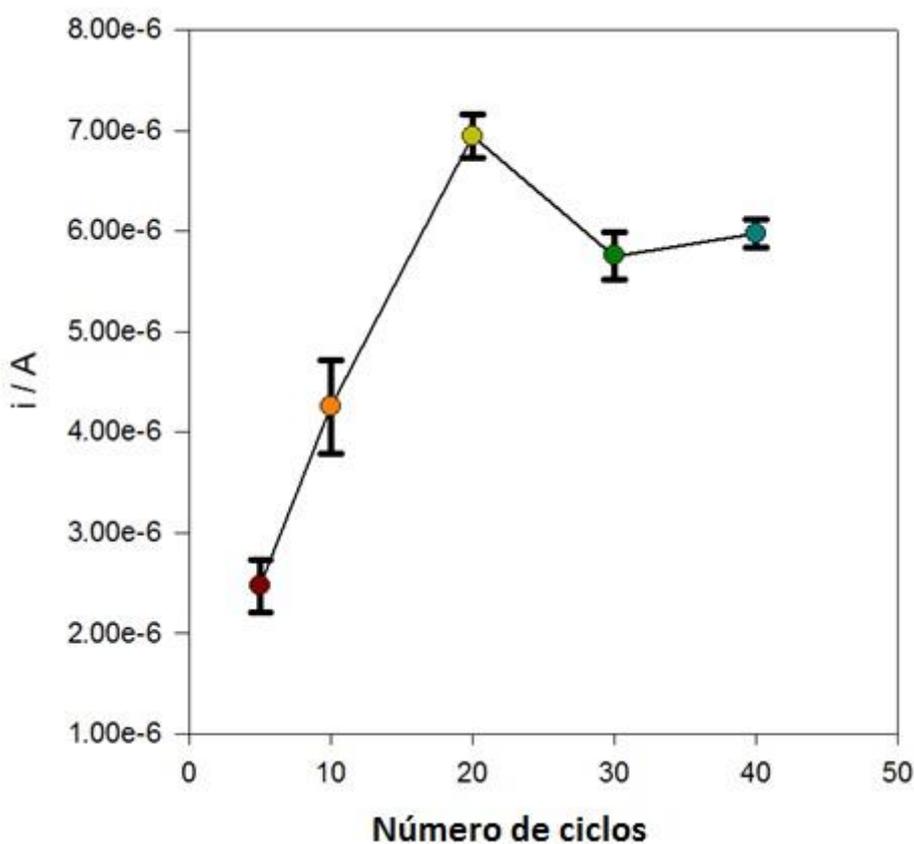


Figura: 3.10 - Variação da intensidade de corrente do pico em função do número de ciclos de polimerização.

A Figura 3.10 mostra a variação da intensidade de corrente em função do número de ciclos de polimerização realizados. É visível um aumento linear da intensidade de corrente de pico entre os 5, 10 e 20 ciclos de polimerização. O maior aumento ocorreu entre os 10 e 20 ciclos. Com 30 ciclos de polimerização há um ligeiro decréscimo da intensidade de pico que estabiliza nos 40 ciclos. Observa-se facilmente na Figura 3.10 que o maior pico de intensidade de corrente foi obtido com 20 ciclos e foram esses os escolhidos para a polimerização. Com o aumento de ciclos há um aumento da espessura do filme, facto que permite também o aumento das cavidades específicas. Contudo, tratando-se de uma fenómeno que ocorre na superfície do eléctrodo, se a espessura do filme for demasiado grande, pode haver dificuldade de extrair as moléculas de NFX que ficam mais próxima do eléctrodo, assim como o acesso posterior das mesmas as cavidades formadas. Provavelmente é que acontece a partir dos 30 ciclos de polimerização, pelo que se verifica uma diminuição do sinal.

3.5.3.1. Otimização das condições de extração

Um dos passos fundamentais na preparação de um MIP é a capacidade de extração da molécula-alvo após polimerização. Isto porque, mesmo que seja possível incorporar a molécula no polímero, se não for possível, após polimerização, remover a molécula de forma eficaz o MIP não será eficiente. O tipo de solvente e o tempo de extração são fundamentais nesta fase.

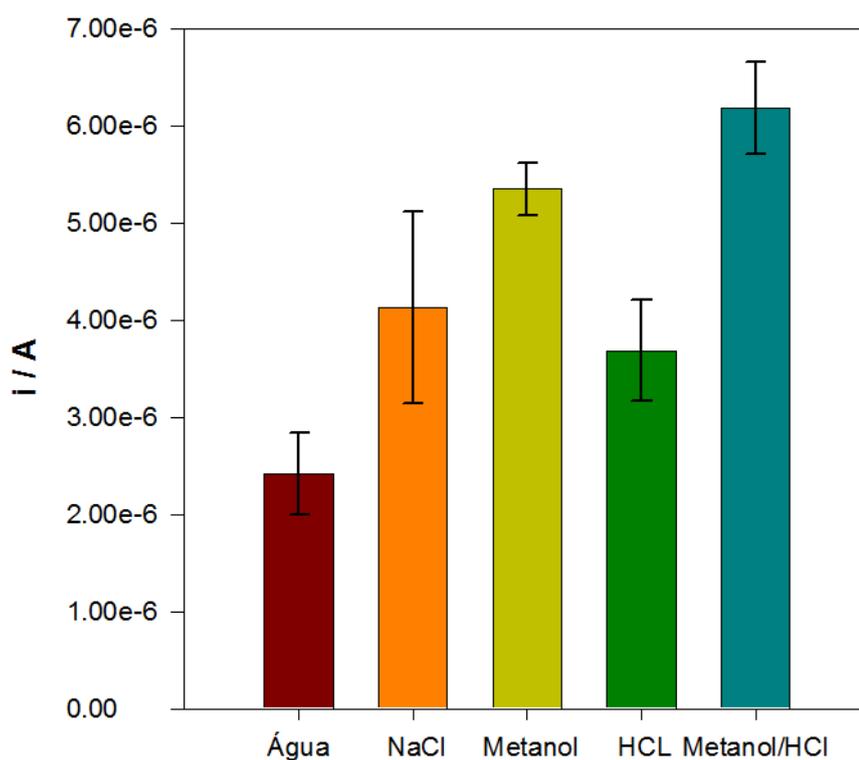


Figura: 3.11 - Variação da intensidade de corrente do pico em função do solvente de extração

No processo de extração foram testados vários solventes de extração, analisando se de seguida a resposta da NLX, sabendo que quanto mais eficiente for a extração, maior será a intensidade de pico de corrente após incubação com NLX, isto porque, se as moléculas de NFX não forem todas removidas do polímero, deixam menos cavidades livres para posterior incubação e como consequência menor será a resposta. Começou-se por testar água que revelou ser o solvente com menor capacidade de extração com um pico de corrente menor. Seguiram-se os solventes NaCl e HCl com valores de picos de corrente semelhante entre eles, mas visivelmente superiores ao da água. O metanol e uma solução composta por metanol e HCl foram os solventes com melhores resultados. Como se verifica na Figura 3.11, os picos de corrente destes dois últimos solventes são superiores aos restantes, o que permite concluir que extraem com maior eficácia. O solvente utilizado foi a solução de metanol e HCl por apresentar o maior pico de corrente e consequentemente revelar-se como o melhor solvente de extração. Paralelamente ao teste dos diferentes solventes, foram testados diferentes tempos de extração entre os 5 e 40 minutos. Verificou-se que a extração máxima foi obtida aos 30 minutos.

3.5.3.2. Otimização das condições de incubação

No processo de incubação da NLX, testou-se vários tempos entre os 5 e 20 minutos. Não se verificaram diferenças significativas entre os valores de pico de corrente, correspondentes aos vários tempos de incubação, pelo que se escolheu a duração de 5 minutos por se considerar um tempo razoável dos tempos testados. Conclui-se que o fator tempo é pouco relevante no processo de incubação da NLX no MIP/MWCNT/SPE, sendo que a ligação ocorre de forma rápida

3.6. Performance Analítica do sensor

Após a otimização e construção do sensor MIP foi avaliada a sua performance analítica. Desta forma estudou-se a resposta do sensor a diferentes concentrações de NLX na gama entre 0,25 a 10 μM nas condições definidas anteriormente, e construiu-se uma curva de calibração representada na Figura 3.12.

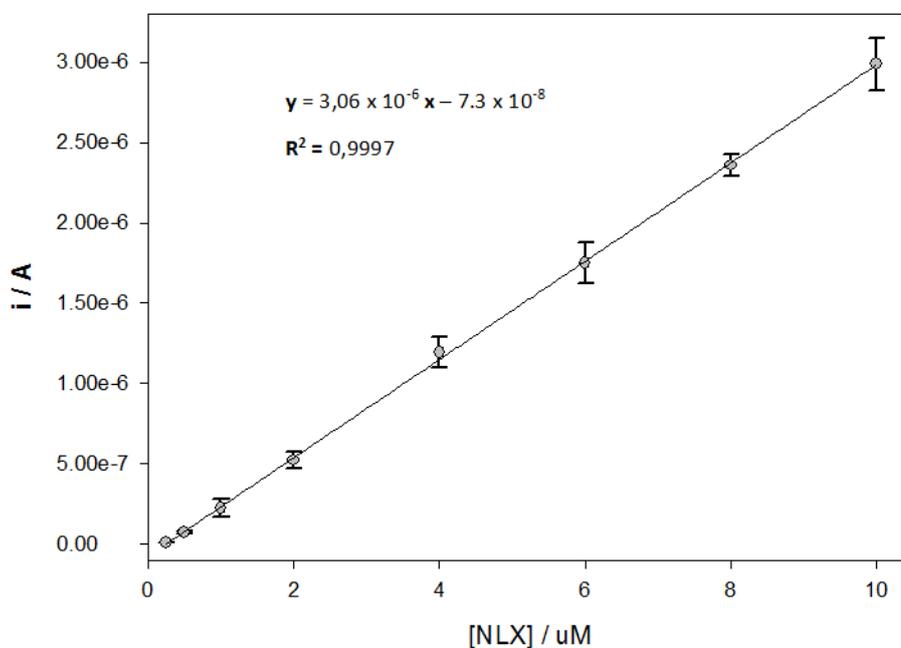


Figura: 3.12- Variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de NLX entre 0,25 e 10 μM .

Os resultados analíticos permitem verificar que na gama de concentrações testadas há uma relação linear entre a intensidade de corrente do pico e a concentração de NLX ($r^2=0,997$, $n=3$). A partir destes dados foi possível estimar o limite de deteção (LOD) de $0,20 \mu\text{M}$ e um limite de quantificação (LOQ) de $0,67 \mu\text{M}$.

Foram ainda realizados ensaios para testar a repetibilidade da resposta analítica, realizando 6 medições consecutivas de uma solução de concentração $4 \mu\text{M}$ usando o mesmo sensor. Com estes dados calculou-se um desvio padrão relativo de 4,6%. Por fim estimou-se a reprodutibilidade entre sensores, comparando a resposta analítica de 6 sensores diferentes para uma concentração de $4 \mu\text{M}$. Os resultados obtidos permitiram calcular um desvio padrão relativo de 9,6%.

Os resultados obtidos permitem afirmar que o sensor construído tem boa precisão, boa resposta analítica e um erro aceitável de construção entre sensores.

3.7. Aplicação em amostras

A parte final do trabalho consistiu na aplicação do MIP/MWCNT/SPCE na deteção de NLX em amostras reais de Soro humano, pretendendo-se essencialmente validar a aplicação em amostras complexas. Na Figura: 3.13 estão representados os resultados obtidos.

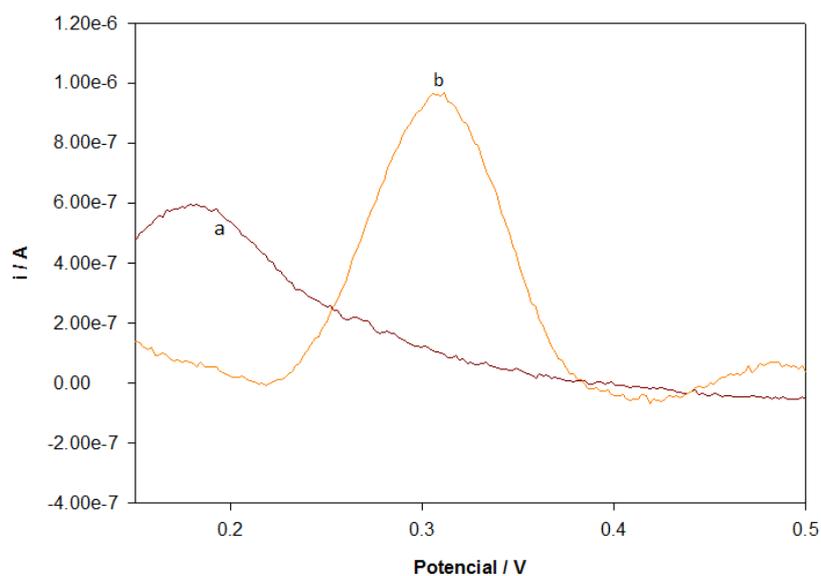


Figura: 3.13 - Voltamogramas obtidos na aplicação do sensor em amostras de soro humano: (a) amostra; (b) amostra dopada.

Verifica-se que para a amostra de soro não dopada (a), não se observa nenhum pico na zona de oxidação da NLX, como seria de esperar. Na amostra dopada (b), é possível verificar o aparecimento do pico correspondente à NLX, facto que comprova a aplicabilidade do MIP nesta amostra. Mostrou-se claramente que foi possível incubar e detetar NLX No soro humano e que nesta amostra não há influencia de qualquer outro pico interferente na gama de potencial usada para deteção da NLX Após sucesso na obtenção de resposta analítica numa amostra de soro humana foram realizado ensaios para calculo das taxas de recuperação. Deste modo amostras de soro formam dopadas com diferentes concentrações de NLX. Para cada amostra recorreu-se ao método das adições padrão para calcular o valor de NLX e estimou-se as taxas de recuperação assim como os desvios padrão. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela: 5.1.

Tabela: 5.1 - Recuperações obtidas para aplicação do MIP/MWCNT/SPCE em amostras de soro humano.

<i>Concentração adicionada (μM)</i>	<i>Concentração obtida (μM)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>CV (%)</i>
0,0	-	-	-
2,0	1,96	98	10
8,0	7,29	91	6

Como seria de esperar, tal como verificado anteriormente no voltamograma, não há qualquer NLX na amostra testada, facto que seria de esperar uma que esta só aparece em caso de toma de NLX, o que não e o caso do soro usado. Para amostras dopadas obteve-se taxas de recuperação, de 98 e 91% com desvios padrão de 10 e 6 %, para concentrações de 2 e 8 μM respetivamente. Estes resultados confirmam a capacidade de aplicação do sensor em amostras de soro, com desvios padrão aceitáveis.

4. Conclusão

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas voltamétricas contribuem para a criação de sensores cada vez mais eficazes. Sensores eletroquímicos seletivos como o que foi desenvolvido neste trabalho, permitem quantificar a NLX contribuindo para a monitorização do estado clínico de pacientes resultante do tratamento de *overdoses* de drogas que matam anualmente milhares de cidadãos.

Neste trabalho, foi desenvolvido um sensor eletroquímico usando MWCNT para melhorar o sinal analítico e MIP para obtenção de seletividade para a NLX. O primeiro passo foi comparar os resultados entre um eletrodo de carbono vítreo e um eletrodo SPCE, tendo-se verificado através das técnicas voltamétricas CV e DPV, picos de correntes maiores nos eletrodos SPCE. Para além dos melhores resultados nos SPCE, a sua utilização revelou-se mais prática e cómoda.. Foram realizados vários estudos de otimização do MIP, como a concentração do polímero 4-ABA e a concentração da NLX, o número de ciclos de polimerização, as condições e tempos de incubação e extração e a concentração de solução do pH. Estudos sobre a importância da presença e concentração dos MWCNT, foram igualmente levados a cabo, tendo-se concluído que melhoram significativamente os sinais obtidos pela aplicação das técnicas voltamétricas CV e DPV. Foi possível concluir através destes estudos e testes, que se obteve um sensor com as melhores características em termos de sensibilidade e seletividade utilizando uma concentração de 4 – ABA de 40 mM, uma concentração de NLX de 0.5 mM, uma polimerização fixada em 20 ciclos com uma concentração de solução de pH 7. Foram testados também diferentes solventes de extração e concluiu-se que a melhor solução de extração foi metanol/HCl. Relativamente à incubação, utilizou-se um tempo de 5 mn

Posteriormente à otimização foi testada a performance analítica do sensor estudando-se a sua resposta a diferentes concentrações de NLX na gama entre 0,25 a 10 μ M e construiu-se uma curva de calibração, tendo se obtido um limite de deteção de 0,20 μ M O sensor obtido apresenta boa precisão, tendo-se obtido um desvio padrão relativo de 4.6%. Estimou-se, igualmente, a reprodutibilidade entre sensores tendo-se obtido um desvio padrão relativo de 9,6%, comparando a resposta analítica de 6 sensores diferentes. Os resultados obtidos permitem afirmar que o sensor construído tem boa precisão, boa resposta analítica e um erro aceitável de construção entre sensores.

Após este processo de construção e otimização, o MIP foi testado com sucesso em amostras de soro humano tendo-se obtido boas taxas de recuperação, superiores a 90%..

A próxima etapa e desafio será testar estes ensaios em amostras sanguíneas e de urina de pacientes reais, com o propósito de verificar a aplicabilidade deste sensor na monitorização de NLX em pacientes

O sensor construído apresenta baixo custo, capacidade de produção em larga escala, pode ser facilmente descartável e incorporado em sistemas portáteis. Deste modo podemos afirmar que apresenta um grande potencial de aplicabilidade.

Bibliografia

- [1] Agência Lusa. “Aumentou número de mortes por causa de drogas e por overdoses em 2014”. [citado em 2016 15 Mar] Disponível em: <http://observador.pt/2016/02/03/aumentou-numero-mortes-causa-drogas-overdoses-2014/>
- [2] Álvarez Y, Farré M. Farmacología de los opioides. Revista de sociodrogalcohol, ISSN 0214-4840. 2005 Jan; 17 (2): 21-40.
- [3] Wheeler E, Burk K, McQuie H, Stancliff S. Guide To Developing and Managing Overdose Prevention and Take-Home Naloxone Projects. Harm Reduction Coalition. 2012 Set.
- [4] PROTOCOLE D’UTILISATION DE LA NALOXONE (NARCAN®), ANTIDOTE DES MORPHINOMIMETIQUES. [citado em 2015 23 Out] Disponível em: http://www.antalvite.fr/pdf/PROTOCOLE_antidote_morphine.pdf.
- [5] Aggrawal A. Opium: the king of narcotics. Narcotic Drugs. 1995 Mai. [citado em 2015 25 Out] Disponível em: <http://opioids.com/narcotic-drugs/chapter-3.html> .
- [6] Gozzani JL. Opioides e Antagonistas. Revista Brasileira de Anestesiologia. 1994 Jan-Fev; 44(1):65 – 73.
- [7] Koneru A, Satyanarayana S, Rizwan S. Endogenous Opioids: Their Physiological Role and Receptors. Global Journal of Pharmacology. 2009; 3 (3): 149-153.
- [8] D.Barton E, Ramos J, Colwell C, Benson J, Baily J, Dunn W. “INTRANASAL ADMINISTRATION OF NALOXONE BY PARAMEDICS”. Prehosp Emerg Care. 2002 Jan-Mar; 6(1):54-58.
- [9] Naloxone: Drug information. [atualizado 2015; citado em 2015 20 Set] Disponível em: www.uptodate.com.
- [10] Paciente grave. Naloxona: um guia prático para dúvidas frequentes. [atualizado 2015; citado em 2015 21 Set] Disponível em: <http://www.pacientegrave.com/2015/05/naloxone-um-guia-pratico-para-duvidas.html> .

- [11]Diagnosia. Naloxona BBraun. [citado em 2015 24 Out] Disponível em: <https://www.diagnosia.com/pt/droga/naloxona-b-braun> .
- [12] Burris S, Norland J, R. Edlin B. Legal aspects of providing naloxone to heroin users in the United States. *International Journal of Drug Policy*. 2001 Set; 12(3) 237–248.
- [13] Kerr D, Dietze P, Kelly A-M, Jolley D. Attitudes of Australian Heroin Users to Peer Distribution of Naloxone for Heroin Overdose: Perspectives on Intranasal Administration. *Journal of Urban Health: Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 2008; 85, No. 3.
- [14] Pubchem: Open chemistry Database. Naloxone. [atualizado 2015; citado em 2015 23 Out] Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284596#section=Top> .
- [15] Trevisan M.G, Poppi R.J. Química Analítica de Processos. *Quím. Nova*. ISSN 1678-7064. 2006; 29, no.5. [Citado em 2016 10 Mar] Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000500029
- [16] Davi C.C.M, Egito E.M.N, et al. DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE BAIXO CUSTO. Cobenge2011 – XXXIX Congresso Brasileiro de Educação em Engenharia. [Citado em 2016 14 Mar] Disponível em: <http://www.abenge.org.br/CobengeAnteriores/2011/sextoestec/art1696.pdf>
- [17] Lowinsohn D, Bertotti M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Química Nova*. ISSN 1678-7064. 2006; 29, no.6. [Citado em 2016 14 Mar] Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000600029
- [18] Aleixo L.M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 2003 Mar.
- [19] Pacheco W.F, Seeman F.S, Almeida V.G.K, Ritta A.G.S.L, Aucélio R.Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Rev. Virtual Quim*. ISSN 1084-6835. 2013; 5 (4): 516-537.

- [20] Li G, Miao P. *Electrochemical Analysis of Proteins and Cells*. Nova Iorque: Springer.2013. [Citado em 2016 08 Mar] Disponível em: <https://books.google.pt/books?isbn=3642342523>
- [21] Moretto L.M, Kaltcher K. *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors*.Nova Iorque: Springer.2014. [Citado em 2016 10 Mar] Disponível em: <https://books.google.pt/books?isbn=1493906763>
- [22] Ciucu A.A. *Chemically Modified Electrodes in Biosensing*. *Biosensors & Bioelectronics*.2014; 5 (3). [Citado em 2016 10 Mar] Disponível em: <http://www.omicsonline.org/open-access/chemically-modified-electrodes-in-biosensing-2155-6210.1000154.php?aid=29767>
- [23] Souza M.F.B. Eléctodos químicamente modificados aplicados á electroánalise: Uma breve abordagem. Departamento de Engenharia de Materiais - Faculdade de Engenharia Mecânica - Universidade Estadual de Campinas. QUÍMICA NOVA. 1997; 20, no.6.
- [24] Puoci F, Cirillo G, Curcio M, Iemma F, Parisi O.M, Spizzirri U.G, Picci N. *Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) in Biomedical Applications*. Department of Pharmaceutical Sciences, University of Calabria I-87036, Rende (CS) – Italy.
- [25] Sousa M.D, Barbosa C.M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. Parte 1: síntese e caracterização. *Quim. Nova*. ISSN 1678-7064. 2009; 85, No.6. [Citado em 2016 03 Mar] Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600045
- [26] Santos M.G, Abrão L.C.C, Freitas L.A.S, Moraes G.O.I, Lima M.M, Figueiredo E.C. Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências. *Instituto Internacional de Cromatografia. Scientia Chromatographica*. 2012; 4(3):161-195.
- [27] Malitesta C, Mazzotta E, A.Picca R, Poma A, Chianella I, A.Piletsky. MIP sensors - the electrochemical approach. *Anal Bioanal Chem.*; 402 (5):1827–1846.
- [28] S. Sharma P, Pietrzyk-Le A, D'Souza F, Kutner W. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. *Anal Bioanal Chem*. 2012;402 (10):3177–3204.

- [29] Figueiredo L, Erny G.L, Santos L, Alves A. Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: A review. Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. 2015 Jun.
- [30] Tarley C.R.T, Sotomayor M.D.P.T, Kubota L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. Quim. Nova. ISSN 1678-7064. 2005; 28, No.6.
- [31] Tarley C.R.T, Sotomayor M.D.P.T, Kubota L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: Aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. Quim. Nova. ISSN 1087-1101. 2005; 28, No.6.
- [32] Degani G.A.L, Cass B.Q, Vieira P.C,. Química Nova Interativa (QNINT) - Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 1998 Mai. [Citado em 2016 15 Jun] Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=conceito.33>
- [33] Chust B.R,. Introdução Cromatografia de Líquidos (HPLC). CROMATOLOGRAFIA DE LÍQUIDOS. BOLETIM SPQ.1990; 39: 44 - 45