



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudo da biocompatibilidade de  
materiais híbridos para aplicações  
biomédicas, adsorção de glucose**

Manuel Diogo Gonçalves Plácido

Orientação | Professor Doutor João Valente Nabais

Professora Doutora Célia M. Antunes

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2018





**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudo da biocompatibilidade de  
materiais híbridos para aplicações  
biomédicas, adsorção de glucose**

Manuel Diogo Gonçalves Plácido

Orientação | Professor Doutor João Valente Nabais

Professora Doutora Célia M. Antunes

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 201



## Agradecimentos

De modo muito particular, a minha gratidão vai para o professor Doutor João Valente Nabais, Departamento de Química da Universidade de Évora, meu distinto mestre, por ter aceite orientar o meu trabalho de Mestrado, por ter partilhado comigo a sua experiência e competência científicas, pelo apoio e orientação que me concedeu em todas as etapas.

O meu reconhecimento à professora Doutora Célia Antunes, Departamento de Química da Universidade de Évora que, dia a dia, me ofereceu apoio e demonstrou inteira disponibilidade e mestria, fundamental para a execução deste estudo.

À professora Doutora Ana Costa, Departamento de Química da Universidade de Évora que, com toda a sua dedicação, disponibilidade e profissionalismo deu apoio no tratamento de dados.

À instituição Universidade de Évora, em particular ao Colégio António Verney e Pólo da Mitra, espaços e pessoas que tornam possível a concretização do estudo e da investigação.

À Rute Martins, à Bruna Ramos, parceiras na complexa leitura da variedade e da incerteza dos fenómenos, que me ajudaram a ver o procedimento científico como extraordinário exercício da investigação.

Aos meus pais que nunca desistem, que sempre me permitiram fazer escolhas, seguir o meu caminho e me fizeram sentir que era capaz. Preciosos nesta, como em tantas etapas da minha vida.

Ao meu irmão Eduardo. A sua presença, a sua força e incrível cumplicidade ajudam-me a superar os desafios, a ser sempre melhor e mais responsável.

Aos meus familiares. Aos meus avós um agradecimento especial: minha avó Alice e meu avô Joaquim.

Aos meus professores e aos meus amigos. Por me ensinarem e me ouvirem.

A todos que partilharam comigo os seus conhecimentos.

*...não me aventuro em terra de sábios.*

*Para estar mais seguro segui as suas lições. Não  
estou certo de ter sido um bom aluno.*

*A minha gratidão vai para os meus mestres.*

anónimo

# Índice

Agradecimentos .....	ii
Índice.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas .....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
I. Introdução .....	1
1.1 Objetivo do Estudo .....	3
II. Enquadramento Teórico.....	3
2.1. Diabetes <i>Mellitus</i> .....	3
2.1.1. Conceito e formas de apresentação.....	3
2.1.2. Epidemiologia da DM .....	4
2.2. Polímeros Molecularmente Impressos.....	4
2.2.1. Polímeros Molecularmente Impressos no contexto geral.....	4
2.2.2. História dos MIP .....	5
2.2.3. Tecnologia de Impressão Molecular.....	7
2.2.4. Aspetos gerais envolvidos na síntese .....	9
2.2.5. Caracterização de MIPs .....	12
2.2.6. Aplicações analíticas dos MIPs como adsorventes.....	13
2.2.7. Potencial aplicação dos MIP na diabetes.....	15
2.3. Materiais compósitos .....	15
2.3.1. Potencial uso dos materiais compósitos .....	16
2.4. Métodos de análise .....	16
2.4.1. Kit de ensaio Glucose (GO).....	16

2.4.2. Dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).....	17
2.4.3. Viabilidade celular: XTT kit de ensaio.....	18
2.5. Cultura Celular .....	20
2.5.1. Cultura celular aderente .....	22
2.5.2. Linha celular BRIN-BD11.....	22
III. Materiais e Métodos .....	25
3.1. Materiais .....	25
3.1.1. Amostras .....	25
3.2. Metodologia.....	25
3.2.1. Determinação enzimática quantitativa de glucose pelo método da Glucose-Oxidase (GO).....	25
3.2.2. Dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) .....	26
3.2.3. Procedimento para avaliação do efeito dos materiais na viabilidade celular .....	28
IV. Resultados e Discussão .....	30
4.1. Adsorção de glucose pelos materiais .....	30
4.2. Estudo do efeito dos materiais na viabilidade das células BRIN-BD11 .....	39
V. Conclusões e Estudos Futuros .....	44
VI. Bibliografia.....	46
VII. Anexos .....	51
Lista de Reagentes.....	51
Lista de Materiais.....	52
Lista de equipamentos.....	53
Técnicas Utilizadas.....	53
Preparação de Soluções .....	54
Preparação do kit de ensaio de Glucose (G0) .....	54



Preparação do método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).....	55
Preparação do kit de ensaio XTT .....	56

## Índice de Figuras

Figura 1 - Número de publicações científicas sobre MIP usados como DDS a partir de 1993 (adaptado de Web of Science). Dia da pesquisa: 20-04-2018. Palavras-chave: drug*deliver* and molecular* imprint* .....	7
Figura 2 - Esquema da síntese dos polímeros impressos. a) monómeros funcionais, b) agente de ligação cruzada, c) Analito (molde); 1) os monómeros funcionais são complexados à molécula molde. 2) Copolimerização entre os monómeros funcionais e o agente de ligação cruzada. 3) Após a polimerização ocorre a formação da rede polimérica em torno do molde. 4) Remoção do molde, deixando o polímero com as cavidades seletivas (adaptado de Leitão, 2014). .....	12
Figura 3 - Ensaio de adsorção (adaptado de Leitão, 2014). .....	13
Figura 4 - Uma representação esquemática de áreas de pesquisa sobre a tecnologia MIP em 1999 (adaptado de Piletsky <i>et al.</i> , 2001). .....	13
Figura 5 - Gráfico que demonstra o número de grupos de pesquisa que estão a trabalhar ativamente com MIPs (publicando em média mais de dois artigos e patentes por ano) (adaptado de Piletsky <i>et al.</i> , 2001). .....	14
Figura 6 - Quantificação de glucose (adaptado de Glucose (GO) Assay Kit, Sigma-Aldrich). .....	17
Figura 7 – (A) Reação de oxidação do grupo aldeído pelo reagente DNS; (B) Reação de redução do reagente DNS (adaptado de dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca). .....	18
Figura 8 - A redução de XTT para formar o derivado de Formazan colorido (adaptado de XTT <i>Cell Proliferation Assay Kit</i> ). .....	19
Figura 9 - Redução colorimétrica de XTT por enzimas celulares (adaptado de XTT <i>Cell Proliferation Assay Kit</i> ). .....	20
Figura 10 - Mecanismos moleculares de eletrofusão de membrana (adaptado de N. H. McClenaghan & Flatt, 1999). .....	23
Figura 11 - Curva de calibração obtida pelo método de Kit de ensaio Glucose (GO). Os pontos apresentados são correspondentes a triplicados. ....	26
Figura 12 - Curva de calibração obtida pelo método DNS em microplaca e com leitura em espectrofotómetro. Os pontos apresentados são correspondentes as triplicados. ....	27

Figura 13 - Células BRIN-BD11 num frasco confluyente, as imagens foram capturadas pelo microscópio invertido digital Evos XI core em 10x de ampliação (adaptado de Public Health England) Dia da pesquisa 20-04-2018. ....	29
Figura 14 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o MIP S. ....	31
Figura 15 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o MIP Q. ....	31
Figura 16 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o MIP U. ....	32
Figura 17 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o F200. ....	33
Figura 18 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o Q200. ....	33
Figura 19 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o F200 0/+1. ....	34
Figura 20 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o F200 +1/0. ....	34
Figura 21 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o Q200 0/+1. ....	35
Figura 22 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o Q200 +1/0. ....	36
Figura 23 - Quantidade máxima adsorvida (mg Glu/g MIP) e Percentagem de remoção para os MIP S, Q e U. ....	37
Figura 24 – Quantidade máxima adsorvida (mg Glu/g MIP) e Percentagem de remoção para os MIP F200, F200 0/+1, F200 +1/0, Q200, Q200 0/+1 e Q200 +1/0. ....	37
Figura 25 - Comparação da quantidade máxima adsorvida (mg Glu/g MIP) e percentagem de remoção entre os três materiais estudados. ....	38
Figura 26 - Atividade desidrogenase por unidades arbitrarias por milhão de células em função da variação de glucose. Os pontos apresentados são correspondentes a triplicados. ....	39
Figura 27 - Estudo da viabilidade celular com diferentes concentrações de glucose (2,8; 5,6; 11,1 e 22,2 mM) e diferentes tempos de incubação (1h, 2h, 4h e 24h): (A)	

ausência de MIP; (B) presença de MIP F200 0/+1; (C) presença de MIP Q200 0/+1. .....	40
Figura 28 - Materiais compósitos, F200 0/+1 e Q200 0/+1, formando um filme à superfície do meio de cultura. ....	41
Figura 29 - Estudo da viabilidade celular com diferentes concentrações de glucose (2,8; 5,6; 11,1 e 22,2 mM) e diferentes tempos de incubação (1h, 2h, 4h e 24h): (A) 1 hora de incubação; (B) 2 horas de incubação; (C) 4 horas de incubação; (D) 24 horas de incubação. ....	42
Figura 30 - Estudo da viabilidade celular com diferentes concentrações de glucose (2,8; 5,6; 11,1 e 22,2 mM) e diferentes percentagens de efeito entre os valores padrão e o material compósito: (A) presença de material compósito F200 0/+1; (B) presença de material compósito Q200 0/+1.....	42
Figura 31 - Materiais compósitos, F200 0/+1 e Q200 0/+1, com cor rosada (A) e acastanhada (B) devido à adsorção de meio de cultura (A) e de reagente XTT (B). .....	43
Figura 32 - Materiais compósitos, F200 0/+1 e Q200 0/+1, com cor rosada (A) e preta (B) devido à adsorção de meio de cultura (A) e de reagente XTT (B).....	43

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Monómeros tipicamente usados na preparação dos MIP (adaptado de Leitão, 2014). .....	10
Tabela 2 - Soluções para determinação enzimática.....	25

## Lista de Abreviaturas

- **DM:** Diabetes *Mellitus*;
- **MIP:** Polímero Molecularmente Impresso;
- **OMS:** Organização Mundial de Saúde;
- **MM:** Molécula modelo;
- **MF:** Monómero Funcional;
- **SPE:** extração em fase sólida
- **SPME:** micro extração em fase sólida
- **HPLC:** cromatografia líquida de alta eficiência
- **CE:** eletroforese capilar;
- **TLC:** cromatografia em camada fina;
- **UV:** radiação ultravioleta;
- **SEM-EDS:** microscopia por varrimento eletrônico;
- **DNS:** ácido Dinitrosalicílico;
- **XTT:** 2,3bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5[(fenilamino) carbonilo]-2H-tetrazolio) de sódio, do inglês (sodium 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl) - 5 - [(phenylamino) carbonyl] -2H-tetrazolium)

## Resumo

### **“Estudo da biocompatibilidade de materiais híbridos para aplicações biomédicas, adsorção de glucose”**

A diabetes apresenta rápida evolução epidemiológica. Inúmeros estudos confirmam o aumento da prevalência e incidência da diabetes no mundo, sendo considerada a epidemia do século XXI e uma das principais causas de morbidade e mortalidade a nível mundial.

O presente trabalho surge neste âmbito de pesquisa cujo objetivo foi testar o perfil de citotoxicidade de novos materiais híbridos - produzidos através de metodologias de impressão molecular - avaliado por culturas de células de insulinoma de rato (BRIN-BD11).

Os materiais foram desenvolvidos a partir de materiais de carbono porosos e estruturas poliméricas específicas de modo a reconhecer e captar seletivamente glucose.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que todos os materiais estudados têm a capacidade de adsorver glucose, em especial o material compósito F200 0/+1 com o maior valor de adsorção máximo (126,55 mg Glucose/g MIP), e que os materiais compósitos parecem não afetar a viabilidade celular.

**Palavras-chave:** Diabetes; Materiais híbridos; Polímeros Impressos Molecularmente (MIP's); Citotoxicidade; Glucose.

## **Abstract**

### **“Study of the biocompatibility of hybrid materials for biomedical applications, glucose adsorption”**

Diabetes presents a rapid epidemiological evolution. Numerous studies confirm the increase of prevalence and incidence of diabetes in the world, being considered the 21st century epidemic and one of the main causes of morbidity and mortality worldwide.

The present work appears in this scope of research whose objective was to test the cytotoxicity profile of new hybrid materials - produced through molecular imprinting methodologies - evaluated by cultures of rat insulinoma cells (BRIN-BD11).

The hybrid materials were developed from hydrothermal, porous carbon materials and specific polymeric structures to recognize and selectively capture glucose.

The results obtained in this work demonstrated that all the materials studied have the ability to adsorb glucose, especially the F200 0/+1 composite with the highest maximum adsorption value (126.55 mg Glucose/g MIP), and that the materials do not appear to affect cell viability.

**Keywords:** Diabetes; Hybrid materials; Molecularly Imprinted Polymers (MIP's); Cytotoxicity; Glucose.





## I. Introdução

A presente dissertação é realizada no âmbito do mestrado em Bioquímica, da Universidade de Évora, para estudo da biocompatibilidade de materiais híbridos para aplicações biomédicas, e em particular, adsorção de glucose.

Dada a incidência a nível mundial da Diabetes *Mellitus* (adiante designada por DM), torna-se de elevada importância avaliar procedimentos nesta área de investigação.

O aumento progressivo da Diabetes *Mellitus* tornou-se um dos problemas de saúde mundial, sendo uma doença crónica cada vez mais frequente nas sociedades modernas, sobretudo em consequência da rápida urbanização, alterações da dieta e estilos de vida sedentários (He *et al.*, 2015).

Os indicadores que confirmam a contínua expansão da DM na maioria das regiões do mundo, evidenciam também o efeito nas taxas de mortalidade e morbidade, o impacto na qualidade de vida dos indivíduos e as avultadas e dispendiosas verbas na prevenção e saúde (He *et al.*, 2015).

Este cenário da saúde mundial obriga a repensar estilos de vida e novos métodos sensíveis e seletivos para aplicação no combate à doença.

As preocupações passam pela necessidade de alertar para este problema e, substancialmente, pela necessidade de investir em processos inovadores no âmbito da investigação, com o propósito de encontrar metodologias e procedimentos adequados de intervenção precoce, pela implementação de programas de prevenção e controlo da doença, com impacto significativo na melhoria da qualidade de vida dos doentes, com manifesto benefício para as comunidades e sociedade em geral (Knowler *et al.*, 2002).

É neste contexto de investimento científico para o desenvolvimento do diagnóstico e monitorização da Diabetes que, principalmente a partir de 1940, se observa uma crescente pesquisa de materiais sintéticos providos de sítios seletivos de reconhecimento. A tecnologia de impressão molecular (do inglês – “*Molecularly Imprinted Polymers*” – MIPs) surge como um método promissor, devido ao carácter promissor desta aplicação e pela facilidade de obtenção dos polímeros.

Ainda que seja uma estratégia inovadora na elaboração de matrizes para a libertação controlada de fármacos, a utilização clínica dos MIP como adsorventes de glicose ainda se encontra pouco estudada em consequência da sua recente aplicação e também pelos extensivos testes que precedem a aprovação de um novo sistema de libertação controlada de fármacos.

Importa ainda referir que o presente trabalho está estruturado da seguinte forma:

- Em primeiro, de forma a promover um maior conhecimento sobre o estudo, a contextualização e enquadramento teórico da problemática em que se abordam aspetos relacionados com Diabetes *Mellitus*, são explicitados os objetivos propostos, incidindo numa breve revisão do *estado da arte* dos materiais MIPs e procedimentos inovadores;

- Em segundo, a metodologia adotada, o desenho de estudo escolhido para a pesquisa, os procedimentos realizados, a caracterização da amostra, e apresentados tanto o material como o tratamento de dados que permitiram o desenvolvimento deste trabalho;

- Em terceiro lugar, expõe-se os resultados, de acordo com as dimensões que foram definidas e em que foram aferidos os resultados, assim como a sua discussão;

- Por fim, apresentam-se as conclusões do estudo, uma reflexão crítica acerca dos procedimentos metodológicos adotados, as suas limitações e ainda as considerações finais desta pesquisa.

## 1.1 Objetivo do Estudo

Este estudo teve como principais objetivos:

1. Estudar a capacidade de novos materiais híbridos produzidos através de metodologias de impressão molecular (MIPs) para adsorção de glicose;
2. Testar e avaliar a citotoxicidade desses novos materiais híbridos.

## II. Enquadramento Teórico

### 2.1. Diabetes *Mellitus*

#### 2.1.1. Conceito e formas de apresentação

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a DM define-se como uma doença crónica que surge quando o pâncreas não produz insulina ou quando o organismo não consegue utilizar de um modo eficaz a insulina produzida e subdivide-se em diversas classes de acordo com a etiologia (“*WHO | Diabetes programme,*” 2017).

A existência de falta de insulina ou a incapacidade de o organismo para utilizar a insulina produzida levam ao aparecimento de perturbações no metabolismo dos lípidos, proteínas e hidratos de carbono (AccesMedicine, 2014).

A hiperglicemia, apresenta-se como uma característica da diabetes não controlada, correspondendo a um aumento excessivo da glicemia. Esta característica surge devido ao défice de insulina normal e/ou funcional, que se pode dever a uma diminuição da secreção pelas células  $\beta$ -pancreáticas, a uma diminuição da resposta à insulina por parte dos tecidos (resistência à insulina) ou a um aumento das hormonas contra regulatórias, como o glucagina, cujos efeitos são os opostos dos da insulina. A origem da hiperglicemia, levando em conta estes fatores, vai determinar o tipo de diabetes (AccesMedicine, 2014).

Os principais tipos de DM - Diabetes *Mellitus* tipo 1 e Diabetes *Mellitus* tipo 2 - apresentam algumas diferenças.

Indivíduos com DM tipo 1 são dependentes de insulina e necessitam, diariamente, de injeções de insulina, a fim de controlar os níveis de glucose no sangue. Por outro lado, indivíduos com DM tipo 2, em geral, podem controlar a sua doença com uma dieta e agentes hipoglicemiantes orais. Ainda assim, a DM tipo 2 pode exigir dependência de insulina se a dieta e os comprimidos não forem suficientes para alcançar um bom controlo metabólico (Dr. Arthur Frazão, 2007).

### **2.1.2. Epidemiologia da DM**

Inúmeros estudos confirmam a prevalência crescente da DM em todo o mundo, tornando-se numa das principais causas de morbilidade e mortalidade a nível mundial. Segundo estimativas da *International Diabetes Federation* (IDF) mais de 32 milhões de cidadãos da União Europeia, ou seja cerca de 10% da população, sofrem desta patologia. A estas estimativas acresce um número equivalente de pessoas que sofre de intolerância à glucose. Prevê-se que até 2030, em resultado da obesidade e do envelhecimento da população, os números aumentem cerca de 20% (IDF, 2017).

A elevada mortalidade associada à patologia é também uma realidade. Segundo dados da OMS, no ano de 2012, a diabetes ocupava lugar de destaque no top 10 das principais causas de morte no mundo, ao surgir na oitava posição (*“WHO | The top 10 causes of death,”* 2017).

Os estudos mais recentes (2017) referem que são cerca de 4,9 milhões de mortes por ano no mundo relacionadas com a doença. Em Portugal, no mesmo ano, ocorreram 7.994,34 mortes relacionadas com a patologia (IDF, 2017).

## **2.2. Polímeros Molecularmente Impressos**

### **2.2.1. Polímeros Molecularmente Impressos no contexto geral**

Polímeros molecularmente impressos (MIPs) são materiais poliméricos sintéticos que contêm sítios de reconhecimento específicos complementares em

forma, tamanho e grupos funcionais à molécula modelo (*template*) e que envolvem um mecanismo de interação baseado no reconhecimento molecular.

Devido aos locais de reconhecimento feitos sob medida para analitos-alvo, robustez intrínseca, baixo custo e longa vida útil, os MIP foram identificados como alternativas eficazes para os recetores naturais (como por exemplo, anticorpos) em ensaios químicos ou em sensores.

A fim de melhorar ainda mais a sua afinidade, seletividade e capacidade de religação, bem como a acessibilidade dos locais específicos, os MIP tendem a ser preparados em partículas de pequena dimensão com uma estrutura bem definida, isto porque, as nanopartículas de MIP têm vantagens importantes, como o aumento da área de superfície total e a melhor acessibilidade à cavidade impressa sobre os monólitos de MIP que são sintetizados da maneira convencional e triturados em formas irregulares (Yang *et al.*, 2011)

Os polímeros são muito utilizados tanto na indústria como no nosso dia a dia, devido à sua funcionalidade diversificada, baixo custo e excelente estabilidade química (Huang, Qian, & Yang, 2018).

Os MIP são capazes de reconhecer especificamente os seus alvos. Em consequência desta importante característica, nas últimas décadas, os MIP têm vindo a ganhar lugar de destaque e a atrair alguma atenção, sobretudo, quando utilizados no reconhecimento molecular (Tan *et al.*, 2018).

No entanto, o foco gradual nos MIP não se limita à existência desta característica, mas é ainda justificado por um conjunto de outras que funcionam como vantagens acrescidas, tais como, a elevada estabilidade mecânica e química, a preparação rápida e económica dos polímeros e uma boa capacidade de adsorção.

Estas características foram aplicadas e estudadas em vários campos da ciência: no uso de MIPs como sensores, na preparação de amostras para análises ambientais e também no reconhecimento seletivo de glicosídeos entre outros (Tan *et al.*, 2018).

### **2.2.2. História dos MIP**

A natureza das interações biomoleculares estimulou sempre o interesse dos cientistas. Especialmente no que se refere aos fenómenos que gerem a

manifestação da resposta biológica e os fatores responsáveis pela seletividade inerente a tais interações.

Tal interesse foi certamente influenciado por três fatos memoráveis da história da ciência:

- 1) a primeira teoria sobre as enzimas de Berzelius (1835);
- 2) a teoria dos recetores de Ehrlich (Limbird, 2004);
- 3) a teoria de formação dos anticorpos de Pauling (1940).

Na teoria de formação dos anticorpos, Pauling indicava que o antigénio portava-se como uma molécula modelo (MM) e os anticorpos eram modelados ao redor desta molécula, produzindo configurações complementares altamente seletivas (Pauling, 1940). Baseando-se nas ideias do seu orientador, Dickey (1952) sintetizou um adsorvente seletivo para a molécula específica. A partir daí, tornou-se de grande interesse elaborar materiais com seletividade atribuída principalmente à sua estrutura tridimensional complementar à da MM (Figueiredo, Dias, & Arruda, 2008).

Em 1972, Wulff e Sarhan (1974) sintetizaram um polímero orgânico enantiosseletivo para o ácido glicérico, em que as interações entre tal molécula e os monómeros funcionais (MF) eram de natureza covalente. A principal característica destes polímeros era a sua alta seletividade, como consequência da boa interação entre os MF e a MM.

Porém, cabe salientar que o processo de retirada da MM do sítio de ligação mostrou-se difícil, sendo necessário, em alguns casos, a aplicação de condições drásticas de hidrólise (Figueiredo *et al.*, 2008).

Na década de 1980, Arshady e Mosbach (1981) reportaram o primeiro artigo sobre um MIP que interagiu com a MM por meio de ligações não-covalentes, permitindo que o processo de quebra de ligação fosse suscetível a fatores como modificação do pH, força iónica, solvente, entre outros (Figueiredo *et al.*, 2008).

Inclusive, Whitcombe *et al.* (1995) propuseram um novo MIP, onde a MM e o MF interagiam por ligações covalentes no momento da síntese e, por ligações não-covalentes no momento de se ligar novamente (outras ligações da MM com o sítio

do MIP). Após a síntese, era necessária uma hidrólise para a retirada da MM do sítio do MIP, permanecendo, nesse local, grupos ligantes capazes de interagir não-covalentemente com a MM em futuras interações. Dessa forma, foi possível associar as vantagens inerentes às metodologias de síntese covalente e não-covalente (Figueiredo *et al.*, 2008).

A partir da década de 1990, observou-se um aumento exponencial do número de trabalhos sobre MIP usados como sistemas de transporte de medicamentos (DDS) (Figura 1), indicando a sua importância em diversas áreas da ciência, com desaque para a química analítica, bioquímica e ciências farmacêuticas (Figueiredo *et al.*, 2008).

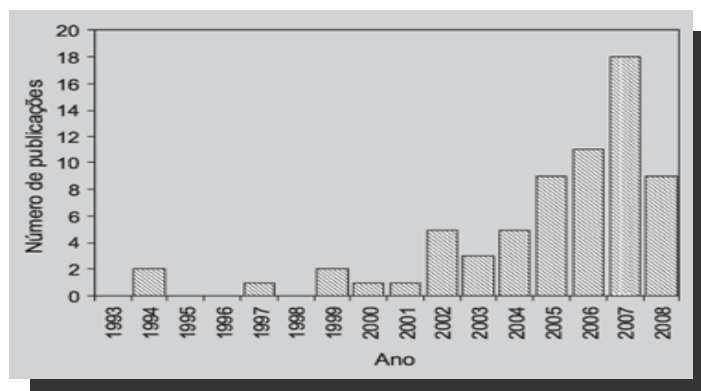


Figura 1 - Número de publicações científicas sobre MIP usados como DDS a partir de 1993 (adaptado de Web of Science). Dia da pesquisa: 20-04-2018. Palavras-chave: drug\*deliver\* and molecular\* imprint\*

### 2.2.3. Tecnologia de Impressão Molecular

A impressão molecular é uma técnica que se baseia no conceito de interações biomoleculares (p.ex. antígeno-anticorpo, enzima-substrato, fármaco-recetor) onde se parte de uma molécula modelo (*template*) e se sintetiza uma estrutura rígida tridimensional (polímero) com cavidades que possuem afinidade para com o *template*.

Essencialmente, imprime-se uma “memória” durante a fase de produção do polímero, que passa a ter cavidades complementares em forma, tamanho e posição dos grupos funcionais a essa molécula modelo o que permite criar um efeito de reconhecimento molecular. Estes polímeros são denominados por polímeros impressos molecularmente, ou em inglês, *molecularly imprinted polymers* (MIP) (Pichon & Chapuis-Hugon, 2008) (Tarley, Sotomayor, & Kubota, 2005).



O conceito de impressão molecular é muito antigo, embora a sua aplicação em diferentes áreas esteja, sobretudo a partir da década de 1990, em constante desenvolvimento. Os primeiros exemplos de impressão molecular pelo uso de polímeros orgânicos sintéticos foram relatados em 1972, por Kieferet *et al.* e Wulff e Sarhan (Fumes, Silva, Andrade, Nazario, & Lanças, 2015).

Os MIPs são conhecidos por serem biocompatíveis e serem nano estruturas sintéticas formadas a partir de interação da molécula do molde com um monómero ou polímero por ligações covalentes, semi-covalente ou ligação não covalente (Deshmukh, Singh, Pravin, & Cavalli, 2015).

Como foi referido, os MIPs apresentam vantagens por terem uma alta seletividade e afinidade para com a molécula alvo, uma alta estabilidade química, facilidade de preparação, capacidade de adsorção e custos reduzidos para a maior parte dos compostos que se pretendam analisar (analito). São estas vantagens que os tornam atrativos sendo utilizados numa variedade de aplicações em diversas áreas científicas (Pichon & Chapuis-Hugon, 2008).

Na sua maioria, os MIPs têm sido utilizados na preparação de amostras para análises ambientais, biomédicas e alimentares atuando em processos de extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME). Podem também ser aplicados a fases estacionárias utilizadas em colunas cromatográficas, particularmente em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (CE) e cromatografia em camada fina (TLC). Existem estudos que demonstram a sua utilização em sistemas de libertação controlada de fármacos, sensores químicos, biossensores e em reações catalíticas (Figueiredo *et al.*, 2008).

A tecnologia de impressão molecular não tem só vantagens, também pode ter associados alguns problemas como por exemplo o derrame (do inglês *bleeding*) da molécula *template*, caso esta não seja completamente extraída do polímero, o que pode vir a interferir com os resultados de análises.

Outros problemas aferidos incluem a possibilidade de existir incompatibilidade com meios aquosos, baixas capacidades de adsorção e lenta transferência de massa (Yang *et al.*, 2011).

#### 2.2.4. Aspectos gerais envolvidos na síntese

A síntese química destes polímeros consiste na reação entre a molécula modelo e moléculas de um monómero funcional.

As moléculas interagem por meio de ligações covalentes ou não-covalentes. Posteriormente formam-se complexos que são polimerizados por meio de um agente que promove ligações cruzadas (*cross-linker*), o que permite originar um polímero rígido. Esta reação de polimerização é iniciada após a adição de um iniciador radicalar. A mistura de polimerização possui, geralmente, um solvente que vai induzir a formação de poros no polímero (solvente porogénico).

Após a formação do polímero as moléculas modelo são removidas por processos de lavagem (p.ex. extração com solventes), isto vai provocar que as ligações entre o *template* e a matriz do polímero sejam quebradas dando origem às cavidades específicas. Estas cavidades concedem ao MIP a capacidade de reconhecer e reter seletivamente a molécula inicial, presente numa qualquer amostra complexa, a partir do mesmo tipo de interações *template*-monómero (Leitão, 2014).


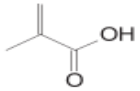
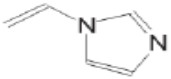
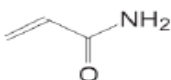
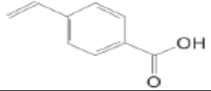
O princípio da impressão molecular leva em consideração a importância na escolha criteriosa dos componentes, tais como, a molécula molde, o monómero, o agente de ligação cruzada, o iniciador radicalar e o solvente porogénico, na medida que a combinação destes determinará e influenciará na sua seletividade (M. G. Santos et al., 2012).

É, assim, imprescindível observar as prováveis interações que acontecem entre a molécula molde e do monómero. A interação estabelecida entre o molde e o monómero funcional determina qual o método de impressão molecular a ser utilizado, podendo ser covalente, não covalente ou semi-covalente (Santos *et al.*, 2012).

A função do monómero é fornecer grupos funcionais que permitam formar um complexo com a molécula molde através das reações já referidas. A força das ligações entre a molécula molde e o monómero afeta a afinidade do MIP e definem a respetiva seletividade das cavidades (Leitão, 2014).

Na Tabela 1, é possível observar alguns monómeros usados na síntese dos MIPs.

Tabela 1 - Monómeros tipicamente usados na preparação dos MIP (adaptado de Leitão, 2014).

Mómonero funcional	Estrutura molecular	Tipo de ligação com o analito
Ácido acrílico		Iónica ou pontes de hidrogénio
Ácido metacrílico (MAA)		Iónica ou pontes de hidrogénio
1-Vinilimidazol		Iónica ou pontes de hidrogénio e coordenação de metais
Acrilamida		Pontes de hidrogénio
Ácido p-vinilbenzóico		Iónica ou pontes de hidrogénio

O ácido metacrílico (MAA) tem sido usado como um monómero universal devido à sua boa apetência para ligações de hidrogénio e ligações iónicas (Yang *et al.*, 2011). O monómero funcional deve estar presente na mistura sempre em quantidade superior à molécula molde de forma a garantir a formação do maior número possível de cavidades específicas.

No entanto, a razão molar entre estes dois componentes deve ser bem estudada pois quantidades muito superiores de monómero terão como consequência a formação de cavidades não específicas (Figueiredo *et al.*, 2008).

As ligações covalentes, entre o monómero funcional e a molécula molde são reversíveis e a forte interação obtida através desses compostos é a principal característica desse processo de síntese. Entretanto, para a remoção da molécula molde, ocorre a clivagem das ligações correspondentes, sendo às vezes necessário a utilização de hidrólise a fim de facilitar o processo de eluição dos analitos (Fumes *et al.*, 2015).

A função do *cross-linker* é fixar grupos de monómeros funcionais numa matriz rígida por meio de ligações cruzadas à volta da molécula impressa permitindo assim

ao polímero manter-se intacto após a remoção dessa mesma molécula. O tipo e a quantidade de *decross-linker* têm também influência na seletividade e capacidade fixativa do MIP.

Desta forma este deverá estar presente em concentrações superiores às do monômero de forma a garantir a porosidade do polímero. O *cross-linkers* mais utilizado é o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) devido à sua capacidade de formar polímeros térmica e mecanicamente estáveis (Leitão, 2014).

O papel do solvente porogénico é observado no processo de impressão molecular. Tanto o solvente utilizado como o respetivo volume têm influência sobre a formação do complexo monômero-*template*. O solvente fornece um meio para dissolução dos reagentes e é responsável pela criação dos poros nos polímeros (Leitão, 2014).

O iniciador radicalar tem como função criar radicais livres de forma a possibilitar o início e a manutenção da reação de polimerização.

Para se iniciar a reação é necessário estímulo físico como o aumento da temperatura ou a ocorrência de radiação ultravioleta (UV). A utilização da radiação UV vai originar tempos de polimerização muito inferiores, no entanto é necessário ter em conta a fotossensibilidade dos restantes reagentes.

O iniciador mais utilizado é o 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) (Figueiredo *et al.*, 2008). Um aspeto importante na síntese do polímero é a remoção do oxigénio presente no ambiente de síntese pois o oxigénio leva à criação de um excesso de radicais que são prejudiciais ao processo de polimerização. Saturando-se o meio com azoto ou através de ultrassons são algumas das técnicas eficazes para remoção do oxigénio presente no ambiente de síntese (Leitão, 2014).

A figura 2 é representativa do esquema de formação de um MIP.

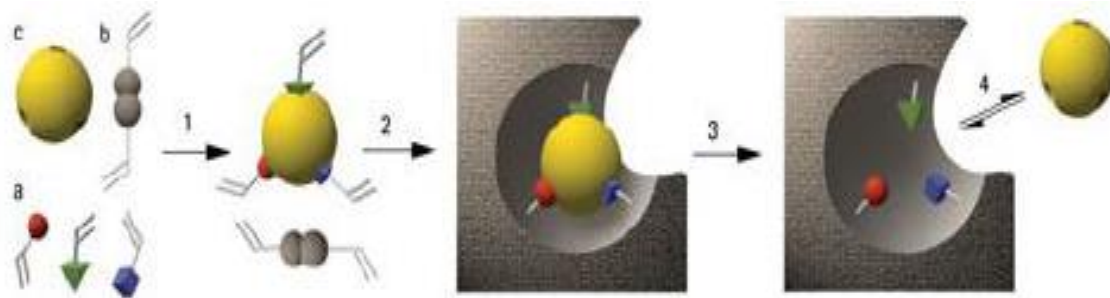


Figura 2 - Esquema da síntese dos polímeros impressos. a) monómeros funcionais, b) agente de ligação cruzada, c) Analito (molde); 1) os monómeros funcionais são complexados à molécula molde. 2) Copolimerização entre os monómeros funcionais e o agente de ligação cruzada. 3) Após a polimerização ocorre a formação da rede polimérica em torno do molde. 4) Remoção do molde, deixando o polímero com as cavidades seletivas (adaptado de Leitão, 2014).

### 2.2.5. Caracterização de MIPs

A caracterização de MIPs é a etapa que ocorre após a síntese e a extração da molécula. É bastante importante pois possibilita a obtenção de informação acerca da característica do polímero produzido.

Nesta etapa, é frequentemente, realizada uma caracterização química, uma caracterização morfológica e uma caracterização em relação à capacidade de ligação do analito (Cormack & Elorza, 2004).

A caracterização química pode envolver microanálise elementar (de carbono, hidrogénio, azoto) e espectroscopia de infravermelho ou UV-Vis, que permite obter informação acerca do grau de polimerização, dos grupos funcionais presentes no polímero e a relação estequiométrica entre o monómero funcional e a molécula modelo (Cormack & Elorza, 2004).

Na caracterização morfológica, em geral, observa-se a superfície do polímero e a avaliação da sua porosidade ao microscópio.

A microscopia por varrimento eletrónico (SEM-EDS) permite obter uma imagem superficial das partículas do polímero e avaliar a presença de cavidades superficiais (Cormack & Elorza, 2004).

A avaliação da porosidade do polímero proporciona informação como a distribuição do tamanho dos poros e o seu diâmetro médio. Esta pode ser feita por porosimetria de mercúrio ou azoto (Cormack & Elorza, 2004).

O estudo das cavidades seletivas do polímero permite avaliar a capacidade de interação com analito e é feita através de ensaios de adsorção. O método descrito na literatura consiste em ensaios de ligação em *batch* como se pode observar na Figura 3 (Leitão, 2014).

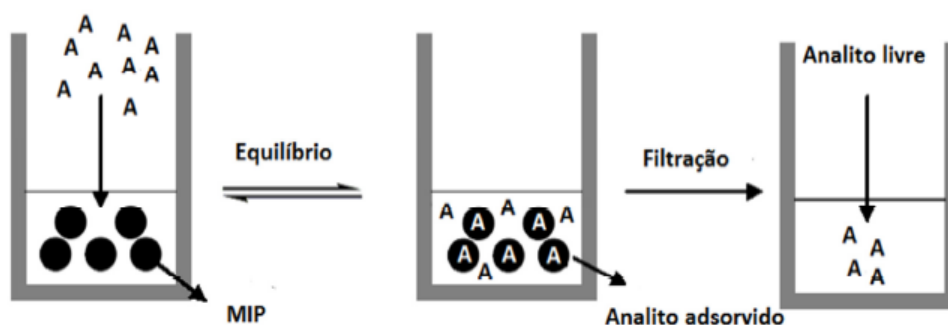


Figura 3 - Ensaio de adsorção (adaptado de Leitão, 2014).

### 2.2.6. Aplicações analíticas dos MIPs como adsorventes

Conforme mencionado, fica evidente a qualidade dos MIPs apresentarem um alto grau de seletividade em relação aos materiais convencionais. Os MIP apresentam inúmeras vantagens e constituem um avanço em diversas áreas.

Estes polímeros além de serem utilizados como adsorventes, são também aplicados em cromatografia líquida, extração em fase sólida, biossensores, síntese química, triagem de fármacos, proteção a grupos não covalentes e como catalisadores (Luk, J., & Wirth, 2010) (Piletsky, Alcock, & Turner, 2001). Na figura 4 estão representadas as áreas de pesquisa sobre a tecnologia MIP em 1999.

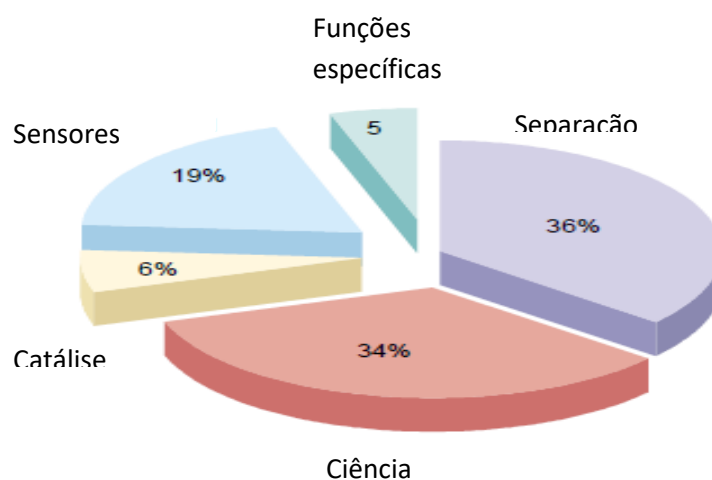


Figura 4 - Uma representação esquemática de áreas de pesquisa sobre a tecnologia MIP em 1999 (adaptado de Piletsky *et al.*, 2001).

Recentemente, os MIPs contendo sítios de reconhecimento específicos complementares em tamanho, forma e funcionalidade química ao modelo, têm atraído a atenção e têm sido aplicados de diversos modos, nomeadamente, como extratores sólidos visando aumentar a seletividade dos processos envolvendo impressão molecular por extração (SPE), uma vez que estes apresentam resistência química a uma grande variedade de solventes orgânicos bem como uma alta seletividade ao analito de interesse em torno do qual o MIP é sintetizado (Haupt, 2001). Na figura 5 podemos observar o número de grupos de pesquisa que estão a trabalhar ativamente com MIP.

Com respeito à determinação de adsorção de glucose, um dos primeiros estudos - onde se utilizam MIPs para esta adsorção - foi realizado por Mijun Penga *et al.* Neste estudo observou-se que os MIPs que utilizam uma molécula modelo têm uma densidade maior de sítios de reconhecimento do que aqueles que utilizam moléculas modelo de tamanho completo, isto resulta numa maior capacidade de adsorção. Desta forma, a glicose pode então ser selecionada como *template* para a preparação de MIPs para o reconhecimento seletivo de glicosídeos (M. Penga, Haiyan Xiang, Xin Hu, Shuyun Shi, & Xiaoqing Chen, 2016).

Os MIPs desempenham um papel crucial na preparação de amostras através da extração seletiva de compostos alvo de várias matrizes. Portanto, é importante entender os mecanismos de adsorção para projetá-los cuidadosamente (Madikizela *et al.*, 2018).

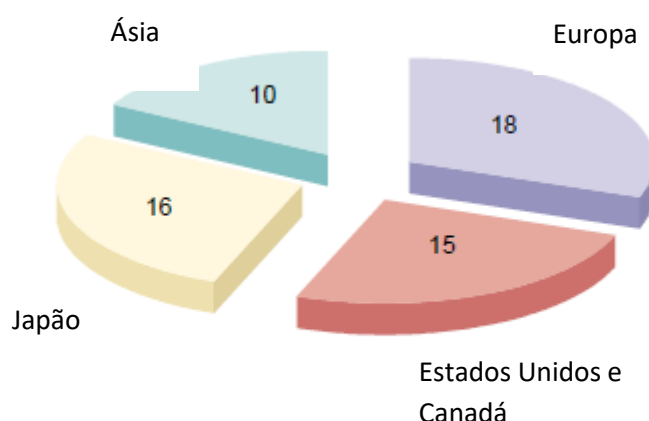


Figura 5 - Gráfico que demonstra o número de grupos de pesquisa que estão a trabalhar ativamente com MIPs (publicando em média mais de dois artigos e patentes por ano) (adaptado de Piletsky *et al.*, 2001).

### **2.2.7. Potencial aplicação dos MIP na diabetes**

Diversas aplicações com o uso de MIPs já foram utilizadas e testadas, entre estas encontram-se: o desenvolvimento de ensaios e de sensores, a produção de polímeros com funções especiais, como matrizes de libertação de fármacos, a produção de materiais de separação, de materiais de reconhecimento molecular para biossensores, de catalisadores altamente específicos e de imitadores de anticorpos (Parmpi & Kofinas, 2004).

Embora os métodos de fixação do *template* variem entre os grupos de pesquisa, a maioria dos estudos até o momento concentrou-se em sintetizar MIPs a partir de monómeros em solventes orgânicos. Devido ao ambiente e às condições em que serão usados os MIP, biossensores farmacêuticos e alguns quimiossensores devem ser planeados de modo a funcionarem adequadamente em ambientes aquosos (Parmpi & Kofinas, 2004).

Ainda que existam diversas aplicações onde os MIP podem ser empregues, pouco se sabe sobre a sua potencial aplicação como adsorvente de glucose. Parmpi e Kofinas (2004) utilizaram os MIP para sintetizarem materiais para aplicações como biossensores, de modo a controlarem quantitativamente a glicose. Utilizaram diferentes hidrogéis MIP e polímeros similares não impressos molecularmente (NIPs) de modo a determinar as capacidades de ligação e seletividades isoméricas destes polímeros em relação aos açúcares, glucose e frutose. Estes MIP demonstraram um notável grau de reconhecimento biomimético à glucose para especificamente e seletivamente a ligar (Parmpi & Kofinas, 2004).

### **2.3. Materiais compósitos**

Embora os MIP sejam amplamente preparados usando matrizes poliméricas orgânicas, os requisitos de alta flexibilidade, rigidez e alta estabilidade térmica e mecânica sugerem uma alternativa, a síntese de um MIP híbrido composto de materiais orgânico-inorgânicos. É neste contexto que surgem os materiais híbridos. Estes possuem inevitavelmente as propriedades adequadas para diversas aplicações industriais, incluindo alta estabilidade, flexibilidade, longa data de



validade e melhores propriedades mecânicas (Ayankojo, Reut, Öpik, Furchner, & Syritski, 2018).

Em aplicações que impliquem o uso de sensores, os materiais híbridos demonstram vantagens importantes em relação aos MIP, como uma área de superfície maior e cavidades impressas mais ordenadas, com propriedades de reconhecimento aprimoradas. Curiosamente, com a tecnologia sol-gel, o material híbrido composto por componentes inorgânicos e orgânicos pode ser formado em nanoescala e integrado num sensor para produzir filmes finos uniformes (Ayankojo *et al.*, 2018).

### **2.3.1. Potencial uso dos materiais compósitos**

Após pesquisa da literatura sobre materiais compósitos observou-se que poucas tentativas foram feitas para a preparação de materiais híbridos para adsorção de glucose ou em testes de viabilidade celular. O uso do processo de adsorção para a determinação de açúcares redutores em diferentes matrizes é um bom avanço na preparação da amostra devido às suas propriedades, incluindo alta área superficial, boa capacidade de adsorção e reutilização (Anacleto *et al.*, 2017).

Até onde se sabe, não foram realizados estudos sobre a dosagem de açúcares de materiais híbridos molecularmente impressos (orgânicos e inorgânicos) com base no método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) nem sobre o efeito destes materiais híbridos sobre a viabilidade celular em células BRIN-BD11.

## **2.4. Métodos de análise**

### **2.4.1. Kit de ensaio Glucose (GO)**

Para a quantificação de açúcares redutores começou-se por utilizar um kit enzimático baseado na glucose oxidase, o kit de ensaio de Glucose (GO). Este kit é utilizado para a determinação enzimática quantitativa de glucose em alimentos e outros materiais.

As enzimas, como ferramentas analíticas, têm sido usadas na indústria alimentícia, bioquímica e farmacêutica. Os métodos enzimáticos são específicos, reprodutíveis, sensíveis, rápidos e, portanto, ideais para fins analíticos. Devido à alta

especificidade e sensibilidade das enzimas, os ensaios quantitativos podem ser feitos em materiais brutos com pouca ou nenhuma preparação de amostra (Procedure, 2011).

O princípio deste método baseia-se na oxidação da glucose a ácido glucónico e peróxido de hidrogénio pela glucose oxidase. O peróxido de hidrogénio reage com o-dianisidina na presença de peroxidase para formar um produto corado. A o-dianisidina oxidada anteriormente vai reagir com o ácido sulfúrico para formar um produto corado (cor rosa) mais estável. A intensidade deste produto de cor rosa quando medida a 540 nm vai ser proporcional à concentração original de glucose (Procedure, 2011).

A figura 6 ilustra o princípio deste método de quantificação de glucose.

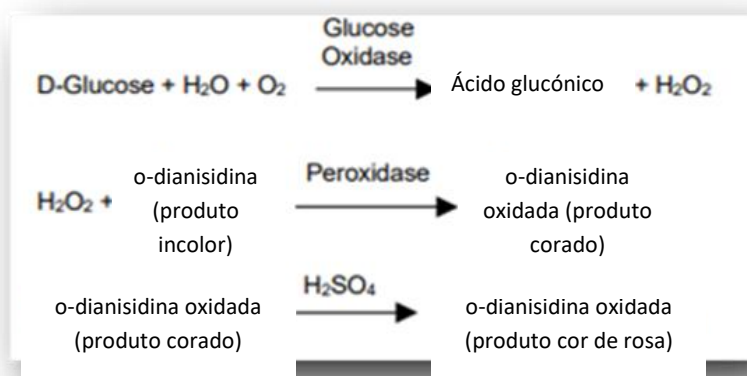


Figura 6 - Quantificação de glucose (adaptado de Glucose (GO) Assay Kit, Sigma-Aldrich).

#### 2.4.2. Dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)

Para a quantificação de açúcares redutores, utilizou-se o reagente ácido Dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Este método testa a presença do grupo carbonilo ( $C=O$ ), encontrado nos açúcares redutores. Na presença de DNS e com aquecimento ( $\approx 80\text{ }^\circ\text{C}$ ), ocorre a oxidação do grupo funcional aldeído, que está presente na glucose, a grupo carboxilo. Ao mesmo tempo o DNS é reduzido a ácido 3 - amino- 5 – nitrosalicílico sob condições alcalinas, como se pode observar pela figura 7.

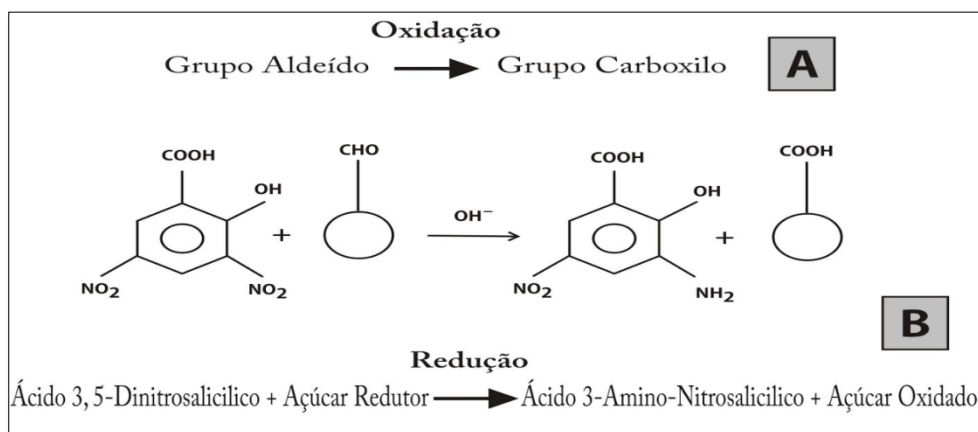


Figura 7 – (A) Reação de oxidação do grupo aldeído pelo reagente DNS; (B) Reação de redução do reagente DNS (adaptado de dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca).

Na forma reduzida o DNS fica com cor avermelhada, que é detetada espectrofotometricamente entre 490-530 nm. É adicionado à solução de DNS o Tartarato de Sódio e Potássio 40% de modo a proteger o reagente da oxidação pelo oxigénio dissolvido em solução. Além deste é também adicionado sulfito de sódio pois este reagente é redutor da ação da glucose (A. A. dos Santos *et al.*, 2017).

A dosagem de açúcares redutores através de DNS requer um considerável volume de reagente e, na sua maioria, leituras individuais de amostras no espectrofotómetro, o que significa um gasto elevado de tempo e de dinheiro em cada análise. Assim sendo, com o intuito de reduzir os custos com a dosagem da glucose e de modo a acelerar a análise de amostras, adaptamos a referida metodologia para a leitura em microplacas de 96 poços.

#### 2.4.3. Viabilidade celular: XTT kit de ensaio

No estudo sobre o efeito dos MIP na viabilidade celular das células BRIN-BD11 foi utilizado o kit XTT (2,3bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5[(fenilamino) carbonilo]-2H-tetrazolio) de sódio) fornecido pela *Biotium*. O kit de ensaio de viabilidade celular XTT fornece um método simples para a determinação do número de células vivas usando leitores de absorvância de microplacas padrão. A determinação do número de células vivas é frequentemente utilizada para avaliar a taxa de proliferação celular e para rastrear agentes citotóxicos (Sigma Aldrich, 2005).

Os sais de tetrazólio são utilizados como reagentes de deteção em estudos de localização histoquímica e em ensaios de biologia celular. O corante de tetrazólio de segunda geração, solúveis, como o XTT, pode ser usado em ensaios de

proliferação celular, de citotoxicidade e de apoptose. A sensibilidade de um ensaio XTT é melhorada pelo uso de um transportador de elétrons intermediário, o PMS (metil sulfato de N-metil dibenzopirazina). O PMS ajuda a reduzir o XTT e a formação do seu derivado *formazan* (Manual, 1988).

O ensaio de proliferação celular XTT foi descrito pela primeira vez em 1988 por Scudiero *et al.* como um método eficaz para medir o crescimento celular e a sensibilidade a fármacos em linhas celulares tumorais. O XTT é um composto incolor ou levemente amarelado que, quando reduzido, torna-se cor de laranja (Figura 8). Esta mudança de cor é conseguida ao se quebrar o anel de tetrazole quaternário carregado positivamente. O produto *formazan* da redução XTT é solúvel e pode ser usado em ensaios em tempo real. Acredita-se que o XTT seja impedido de entrar nas células devido à sua carga negativa líquida (Manual, 1988).

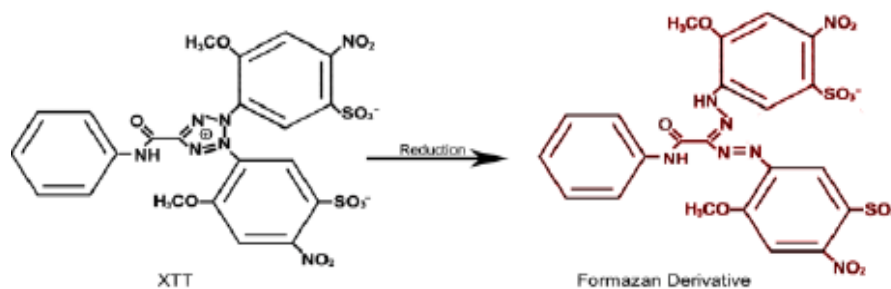


Figura 8 - A redução de XTT para formar o derivado de Formazan colorido (adaptado de XTT Cell Proliferation Assay Kit).

O princípio deste método, semelhante ao método MTT (Brometo de (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), baseia-se na medição por parte do XTT da viabilidade celular com base na atividade das enzimas mitocondriais em células vivas que reduzem o XTT e são inativadas logo após a morte celular. Ao contrário do *formazan* insolúvel em água produzido a partir de MTT, o XTT é rapidamente reduzido a um produto de cor laranja altamente solúvel em água, omitindo assim o passo de solubilização necessário para o ensaio MTT. A quantidade de produto solúvel em água gerado a partir do XTT é proporcional ao número de células vivas na amostra e pode ser quantificada medindo a absorvância utilizando um comprimento de onda de 475 nm (Sigma Aldrich, 2005).

A redução colorimétrica pode ser observada na figura 9.

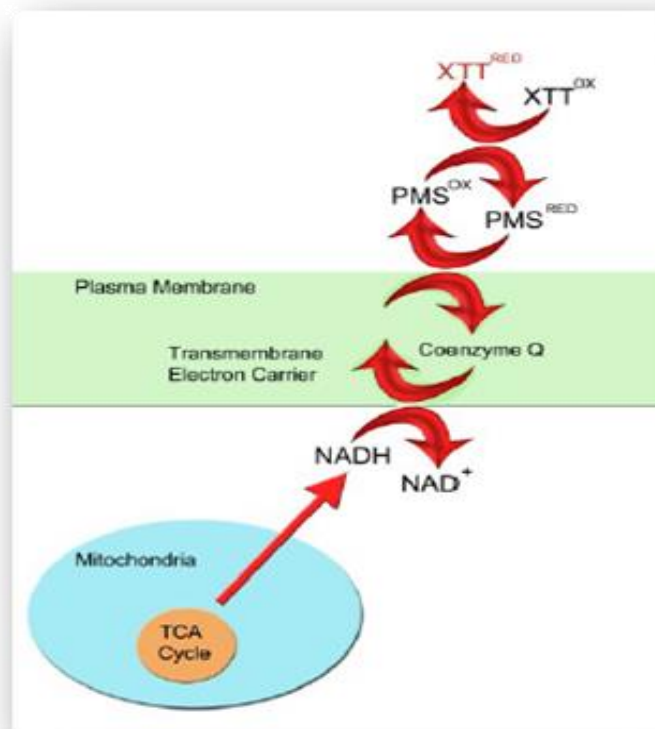


Figura 9 - Redução colorimétrica de XTT por enzimas celulares (adaptado de XTT Cell Proliferation Assay Kit).

O XTT pode ser usado sozinho como uma reação de detecção, mas os resultados não são ideais. Assim, a sensibilidade de um ensaio XTT é melhorada pelo uso de um transportador de elétrons intermediário, o PMS (metil sulfato de N-metil dibenzopirazina). O PMS é o Reagente de Ativação incluído no Kit de Ensaio de Proliferação Celular XTT. Estudos sugerem que o PMS medeia a redução de XTT capturando elétrons na superfície da célula, ou num local na membrana plasmática que é facilmente acessível, e forma um intermediário reativo que reduz o XTT ao seu produto *formazan* altamente pigmentado (Manual, 1988).

## 2.5. Cultura Celular

O termo "cultura celular" descreve um método para o crescimento de células eucarióticas sob condições laboratoriais apropriadas (Bakkar, 2012).

O cultivo de células na investigação científica é uma tecnologia amplamente usada. Esta tecnologia visa informar acerca dos mecanismos básicos da célula e dos processos mais complexos como a sinalização, funcionamento e comportamento de

tecidos humano, animal ou vegetal. Aliada à evolução da engenharia celular e genética, esta tecnologia deixou de se limitar a fins experimentais e alargou as perspectivas para o seu uso, possibilitando o cultivo de diversos tipos celulares com fins biotecnológicos e farmacêuticos (Macedo, 2014).

O cultivo celular é um processo consistente e confiável que tem uma boa reprodutibilidade de resultados que podem ser obtidos usando diversos tipos de células clonais. É um processo extremamente utilizado pelo qual as células são removidas do seu ambiente natural e cultivadas artificialmente sob condições controladas. O objetivo deste processo é o de replicar elementos do sistema *in vivo* num ambiente controlado *in vitro*, permitindo o teste de hipóteses relacionadas com as componentes celulares na ausência de influências fisiológicas externas (Bakkar, 2012). As células podem ser removidas do seu habitat diretamente e desagregadas com enzimas ou mecanicamente antes da colheita ou podem ser um derivado de uma linhagem de células que foi criada anteriormente (Essays, 2013).

As condições exigidas para cada cultura variam, porém as condições dos ambientes artificiais são consistentes. As células devem ser cultivadas num recipiente adequado que contenha um meio que forneça nutrientes vitais, como aminoácidos, vitaminas, glúcidos e minerais. Também são indispensáveis fatores de crescimento e hormonas também são necessários, assim como oxigénio e dióxido de carbono. Deve-se controlar e regular o ambiente físico-químico que inclui o pH e a pressão osmótica, bem como a temperatura. Esta deve ser mantida a aproximadamente 37 °C, os níveis de CO<sub>2</sub> a 5% e a humidade a 95% de modo a manter a estabilidade do pH (Essays, 2013).

Culturas celulares primárias são culturas que crescem e mantêm células dissociadas do seu tecido parental através de métodos mecânicos ou enzimáticos. Estas tanto podem ser células aderentes ou células suspensas. As células aderentes são geralmente provenientes de órgãos como o rim e requerem fixação ao frasco de cultura para crescimento. As células em suspensão são o oposto e não requerem fixação ao frasco de cultura para crescimento. Estas são células que provêm do sangue, onde não estão presas a nada, mas que se encontram suspensas, como por exemplo, no plasma como linfócitos (Essays, 2013).

Uma cultura secundária é uma cultura primária que foi sub-cultivada. A subcultura ocorre quando as células são transferidas de um recipiente de cultura

para outro. Esta passagem fornece nutrientes frescos e espaço para o crescimento contínuo, isto porque uma cultura primária tem um tempo de vida finito assim necessita de ser sub-cultivada de modo a não se perder a cultura celular (Essays, 2013).

Após a primeira subcultura, a cultura passa a ser conhecida como linha celular. As células passam por um número finito de ciclos de replicação antes de se dar a morte celular. Isto significa que algumas linhas de células serão linhas celulares finitas. No entanto, algumas células sofrem transformação. Isto pode ocorrer espontaneamente, mas também pode ser induzido por vírus *in vitro*. Esta transformação dá à célula a capacidade de se dividir infinitamente, como ocorre nas células HeLa. A linha HeLa é a linha celular contínua mais antiga (Essays, 2013).

O cultivo celular estabeleceu-se como uma técnica para obtenção de células para tratamento e reconstrução de tecidos lesados. Deste modo, o cultivo de células fixou-se como um dos pilares para a biologia celular e molecular, fazendo desta, uma prática laboratorial difundida e rotineira (Macedo, 2014).

### **2.5.1. Cultura celular aderente**

Neste método as células da cultura crescem numa superfície de fixação de um frasco de cultura. A superfície de fixação é geralmente revestida com substâncias normalmente encontradas na matriz extracelular para aumentar as propriedades de adesão. As vantagens das culturas de células aderentes são que as células têm a capacidade de manter a sua morfologia *in vivo* e as condições de cultura, como temperatura e nutrientes, são fáceis de controlar (Bakkar, 2012).

### **2.5.2. Linha celular BRIN-BD11**

No presente, as técnicas de biologia molecular oferecem a oportunidade de projetar novas linhas de células  $\beta$  pancreáticas que possuem muitos atributos de células normais secretoras de insulina (N. H. McClenaghan & Flatt, 1999).

Vários métodos foram adotados para produzir linhas celulares secretoras de insulina para pesquisa de células  $\beta$  pancreáticas e potencial transplante de diabetes. Nos estudos de secreção de insulina, as células RINm5F, derivadas do insulinoma

de rato *New England Deaconess Hospital* (NEDH) induzido por radiação de raios X, e as células HIT-T15 produzidas pela transformação do vírus símio 40 (SV40) de células  $\beta$  pancreáticas de hamster têm sido bastante utilizadas (N. H. McClenaghan & Flatt, 1999).

Embora as linhas celulares derivadas do insulinoma tenham a vantagem de crescimento ilimitado na cultura de tecidos, muitas exibem grandes diferenças na resposta secretora de insulina à glicose quando comparadas aos ilhéus normais. Apesar do facto de que estas células têm servido por muito tempo como modelos celulares úteis, as deficiências observadas nestas linhagens celulares destacam a importância da adoção de novas abordagens para a engenharia de linhas de células  $\beta$  pancreáticas secretoras de insulina (N. H. McClenaghan & Flatt, 1999).

É neste sentido, de se adotarem novas abordagens para a engenharia de linhas de células  $\beta$  pancreáticas secretoras de insulina, que entra a fusão célula-célula *in vitro* e que provou ser uma ferramenta valiosa na pesquisa de membranas, no mapeamento genético e, em particular, na engenharia genética.

Embora a fusão celular tenha sido introduzida já em 1909 por Küster, as abordagens convencionais continuam muitas limitações, muitas vezes severas. De modo a ultrapassar estas limitações, Zimmermann e os seus colaboradores desenvolveram uma técnica de fusão elétrica. Como pode ser observado pela Figura 10, na eletrofusão as células são levadas a um contato de membrana apertado num campo elétrico não homogéneo de corrente alterna e os pares de células são depois fundidos usando pulsos elétricos de corrente direta, curtos e de alta intensidade (N. H. McClenaghan & Flatt, 1999).

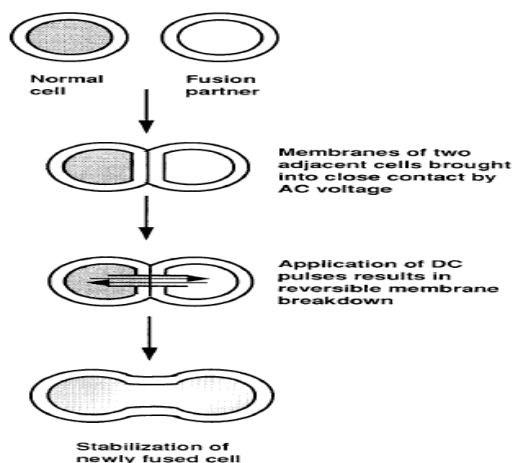


Figura 10 - Mecanismos moleculares de eletrofusão de membrana (adaptado de N. H. McClenaghan & Flatt, 1999).



Três novas linhas celulares clonais (BRIN-BG5, BRIN-BG7 e BRIN-BD11) foram produzidas usando a abordagem por eletro fusão de células normais de rato NEDH com células RINm5F imortalizadas, que também são derivadas do insulinoma de rato NEDH transplantável. Esta fusão intraespecífica deve produzir uma linhagem celular híbrida estável que retenha as importantes características funcionais das células  $\beta$  pancreáticas normais, como a resposta à glicose (N. H. McClenaghan & Flatt, 1999).

Neste estudo foram utilizadas as células da linha celular secretora de insulina, BRIN-BD11, obtida por eletro fusão de células  $\beta$  pancreáticas normais de rato NEDH com uma linha celular imortal, RINm5F, crescem em monocamadas, com características epiteliais e mantêm a estabilidade em cultura, pelo menos até 50 passagens.

Estas células respondem à glicose no intervalo 4,2-16,7 mM (N. McClenaghan *et al.*, 1996).

### III. Materiais e Métodos

#### 3.1. Materiais

##### 3.1.1. Amostras

Neste trabalho foram utilizados 9 materiais produzidos no trabalho de Doutorado de Carlos Eduardo Laginhas, designadamente 3 MIPs (MIP S, MIP Q, MIP U), 2 carvões preparados por via hidrotérmica (F 200 e Q 200) e 4 materiais compósitos sendo materiais híbridos MIP/carvão (F 200 (0/+1), F 200 (+1/0), Q 200 (0/+1) e Q200 (+1/0). Mais detalhes sobre a preparação de alguns materiais podem ser obtidos em C. Laginhas (2016).

#### 3.2. Metodologia

##### 3.2.1. Determinação enzimática quantitativa de glucose pelo método da Glucose-Oxidase (GO)

Para a determinação enzimática quantitativa de glucose utilizou-se o Kit enzimático baseado no método da Glucose-Oxidase (GO). Neste procedimento de determinação enzimática quantitativa de glucose começou-se por pipetar as soluções da Tabela 2 para os poços marcados.

Tabela 2 - Soluções para determinação enzimática

Poço	Água Desionizada (mL)	Amostra (mL)	Padrão de glucose (mL)
Branco	50 µL	---	---
Padrão #1	49 µL	---	1 µL
Padrão #2	48 µL	---	2 µL
Padrão #3	47 µL	---	3 µL
Padrão #4	46 µL	---	4 µL
Teste	---	50 µL	---

No tempo zero, iniciou-se a reação adicionando 100 µL de Reagente de Ensaio (ver anexo) ao primeiro poço e esperou-se cerca de 10 segundos entre pipetagens nos poços. Deixou-se reagir exatamente 30 minutos a 37 °C numa placa de aquecimento. Ao fim dos 30 minutos interrompeu-se a reação adicionando 100 µL de ácido sulfúrico 12 N (ver anexo) a cada poço com intervalo de aproximadamente 10 segundos entre pipetagens.

Após a placa ter arrefecido durante 5 minutos à temperatura ambiente, leu-se a absorvância de cada tubo contra o reagente branco a 540 nm.

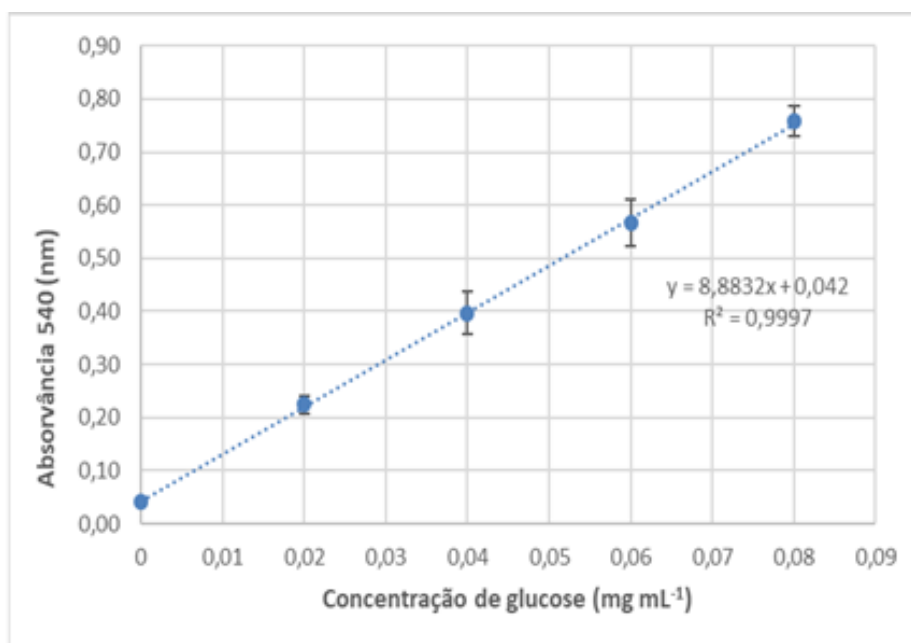


Figura 11 - Curva de calibração obtida pelo método de Kit de ensaio Glucose (GO). Os pontos apresentados são correspondentes a triplicados.

### 3.2.2. Dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)

Para a quantificação de açúcares redutores, utilizou-se o reagente ácido Dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

A dosagem de glicose consumida neste método foi realizada através de um novo método colorimétrico, adaptado do método descrito por Miller (Miller, 1959).

Neste novo método, em vez de se utilizarem tubos, a reação processou-se numa microplaca de 96 poços (de fundo chato – TPP), conforme o seguinte protocolo: em

cada poço da microplaca foram adicionados 10 µL de amostra, 90 µL de tampão Krebs-Ringer e 25 µL de DNS (ver anexo).

As curvas de calibração, com oito concentrações de glucose (0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 5,0 mg/mL), foram montadas na microplaca. Depois das pipetagens das amostras, do tampão e do DNS a microplaca foi fechada com a respectiva tampa e colocada na estufa a aproximadamente 80 °C e deixada a incubar durante 1 hora. Após o tempo de incubação, a microplaca foi retirada da estufa e arrefeceu durante 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de arrefecida, a microplaca foi levada ao leitor de microplacas e as amostras foram lidas a 490 nm e a 630 nm (referência). As concentrações, em mg/mL de glucose, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração, utilizando as medidas de absorvância obtidas diretamente em folhas de cálculo do Microsoft® Excel.

Todas as medidas foram realizadas em triplicado.

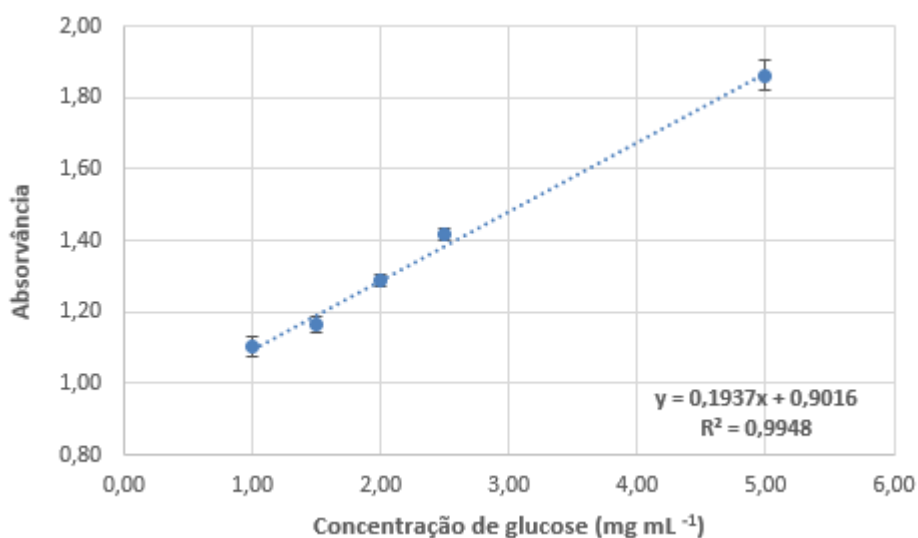


Figura 12 - Curva de calibração obtida pelo método DNS em microplaca e com leitura em espectrofotômetro. Os pontos apresentados são correspondentes as triplicados.

### 3.2.3. Procedimento para avaliação do efeito dos materiais na viabilidade celular

Para avaliação do efeito dos materiais sobre células, foi usada a linha celular BRIN-BD11. O metabolismo destas células varia em função da concentração de glucose, afetando a atividade desidrogenase. Por esta razão é importante efetuar a análise do efeito dos materiais numa gama de concentrações de glucose que tenham em conta a curva dose-resposta destas células ao secretagogo.

Todos os passos inerentes à cultura de células BRIN-BD11 foram realizados numa câmara de fluxo laminar, de forma a manter a preparação em condições estéreis.

Todos os materiais que entraram em contacto com as células foram previamente esterilizados, por autoclavagem e passados por Etanol 70% antes de entrarem na câmara. Durante o presente estudo, as células BRIN-BD11 foram invariavelmente mantidas a 37°C em frascos de cultura de 75 cm<sup>3</sup> com 20 mL de meio de cultura RPMI (ver anexo), suplementado com 10% de *Fetal Bovine Serum* (FBS) e 1% de antibiótico (10,000 unidades de penicilina e 10 mg/mL de streptomina).

Ao atingir a confluência, as células são passadas para novo frasco de cultura. Neste processo o meio de cultura foi aspirado e foram colocados 5 mL de solução de versénio (ver anexo). As células foram colocadas durante 5 minutos na estufa que se encontrava a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação as células foram passadas para um tubo de falcon de 15 mL e centrifugadas durante 5 minutos a 500 g de forma a obter um sedimento celular.

O sedimento celular foi ressuspensão em meio de cultura incompleto, procedeu-se à contagem celular em câmara de New Bauer para aferir a concentração de células. As células foram colocadas em microplacas de 96 poços (25000 cel/poço) para a realização dos ensaios biológicos. No dia seguinte ao plaqueamento das células o meio foi aspirado e os poços foram lavado com 100 µL de meio G0 (ver anexo). De seguida adicionou-se 0,001 g de MIP a cada poço que continha diferentes concentrações de glucose (em mM 2,8; 5,6; 11,1 e 22,2) (ver anexo).

Diferentes placas incubaram-se por períodos de 1, 2, 4 e 24h na estufa. Decorrido o tempo de incubação foi adicionado 25 µL de reagente XTT (*Biotium*) a cada poço

e incubou-se durante cerca de 3h. Decorrido o tempo de incubação leu-se a absorvância a 450 nm e a 655 nm (referência).

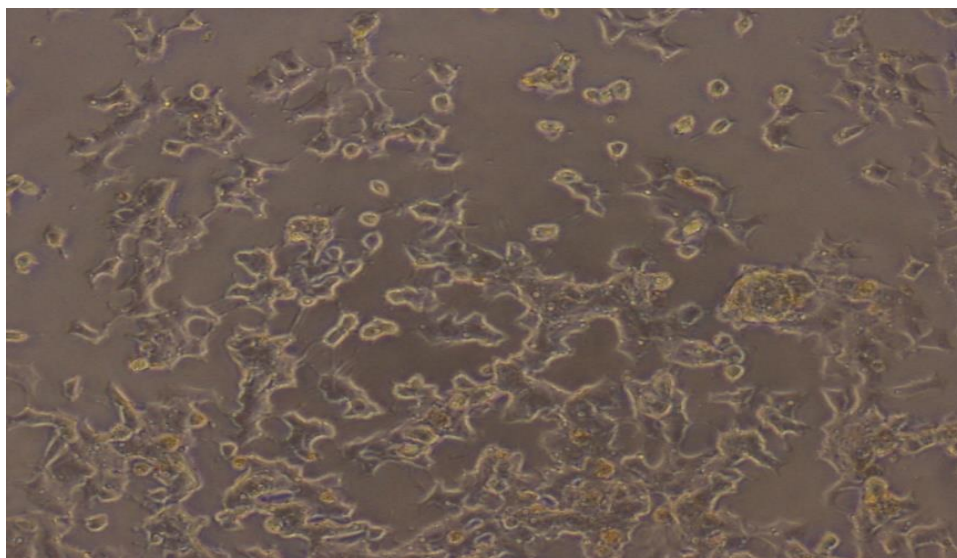


Figura 13 - Células BRIN-BD11 num frasco confluyente, as imagens foram capturadas pelo microscópio invertido digital Evos XI core em 10x de ampliação (adaptado de Public Health England) Dia da pesquisa 20-04-2018.

## IV. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos nos nove materiais (S, Q, U, F200, Q200, F200 0/+1, F200 +1/0, Q200 0/+1 e Q200 +1/0) utilizados no estudo da adsorção de glucose, utilizando a dosagem de açúcares redutores pelo método do DNS e também dos dois materiais compósitos (F 200 0/+1 e Q200 0/+1) utilizados no estudo do efeito na viabilidade das células BRIN-BD11.

### 4.1. Adsorção de glucose pelos materiais

Para a quantificação de açúcares redutores, utilizou-se o método do ácido Dinitrosalicílico (DNS). Este método testa a presença do grupo carbonilo (C=O), encontrado nos açúcares redutores. Na forma reduzida o DNS fica com cor avermelhada, que é detetada espectralmente entre 490-530 nm.

Foram realizados testes de adsorção de glucose para todos os materiais recorrendo ao método de DNS e todos eles foram testados nas mesmas condições e com as mesmas concentrações de glucose (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 5,0 mg/mL). A microplaca foi fechada com a respetiva tampa e colocada na estufa a aproximadamente 80 °C e deixada a incubar durante 1 hora. Os valores de absorvância das placas foram lidos a 490 nm e a 630 nm (referência).

As figuras 14 a 22 representam a quantidade de glucose adsorvida em função da concentração de glucose para cada um dos materiais.

Observa-se que existe uma dispersão nos resultados experimentais, que em alguns casos é significativa, o que de alguma forma limita a análise dos resultados e as conclusões do trabalho. Contudo, e mesmo com esta dispersão, é possível observar o comportamento geral de cada material e traçar algumas conclusões gerais.

A figura 14 diz respeito à quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o MIP S.

É de notar que para este MIP temos um valor máximo de adsorção de 98,08 mg glucose/g MIP quando a concentração final é de 3,997 mg/mL. De assinalar também que não foi atingido um patamar de adsorção para este MIP o que pode indicar que

o MIP S pode continuar a adsorver glucose com o aumento da concentração de glucose.

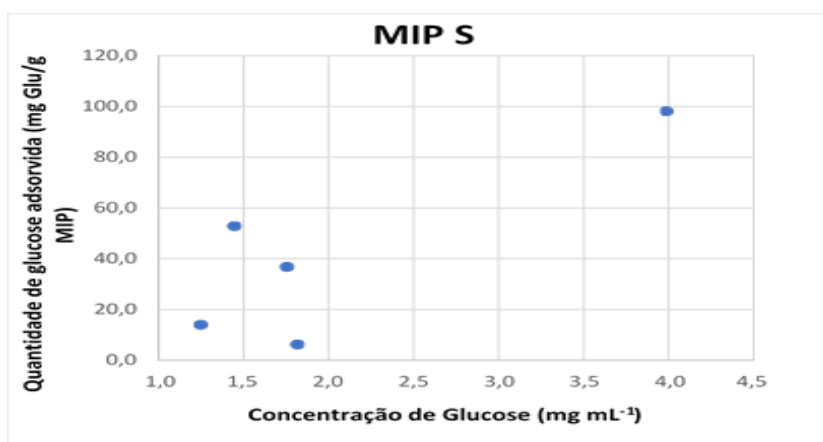


Figura 14 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o MIP S.

A figura 15 diz respeito à quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o MIP Q. É de notar que para este MIP temos um valor máximo de adsorção de 40,14 mg glucose/g MIP quando a concentração final é de 1,698 mg/mL. De destacar também que os resultados mostram que se pode estar a atingir um patamar de adsorção para este MIP o que pode indicar que o MIP Q atingiu a sua capacidade máxima de adsorção de glucose quando a concentração de glucose chegou aos 1,698 mg/mL e que se se continuar a aumentar a concentração de glucose este MIP não irá adsorver mais.

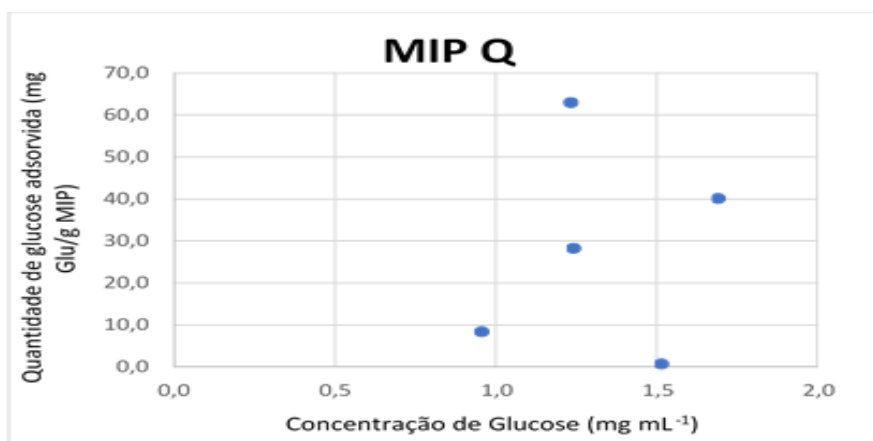


Figura 15 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o MIP Q.

A figura 16 diz respeito à quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o MIP U.

É de notar que para este MIP temos um valor máximo de adsorção de 11,22 mg glucose/g MIP quando a concentração final é de 2,229 mg/mL. De destacar também



que os resultados mostram que se pode estar a atingir um patamar de adsorção para este MIP o que pode indicar que o MIP U atingiu a sua capacidade máxima de adsorção de glucose quando a concentração de glucose chegou aos 2,229 mg/mL e que se se continuar a aumentar a concentração de glucose este MIP não irá adsorver mais.

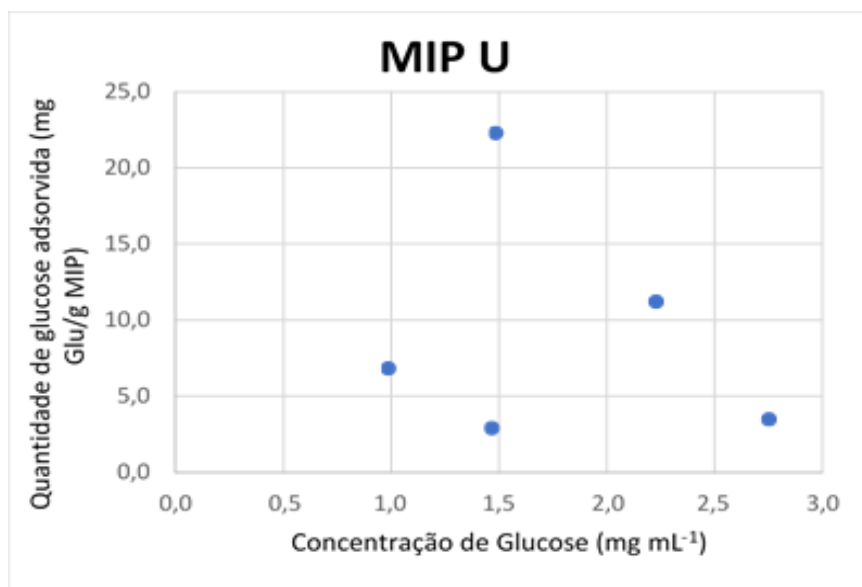


Figura 16 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o MIP U.

A figura 17 diz respeito à quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o F200.

É de notar que para este material de carbono temos um valor máximo de adsorção de 16,03 mg glucose/g MIP quando a concentração final é de 4,878 mg/mL. De destacar também que os resultados mostram que se pode estar a atingir um patamar de adsorção para este material o que pode indicar que o F200 atingiu a sua capacidade máxima de adsorção de glucose quando a concentração de glucose chegou aos 4,878 mg/mL e que se se continuar a aumentar a concentração de glucose este MIP não irá adsorver mais.

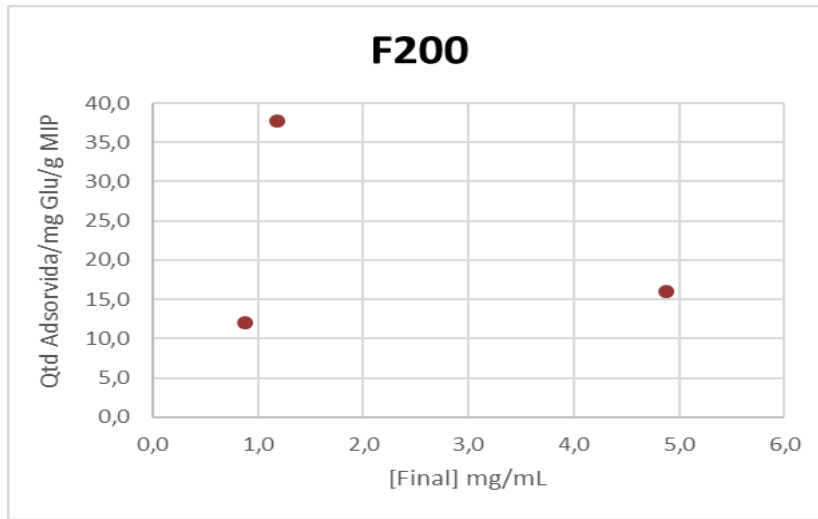


Figura 17 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o F200.

A figura 18 diz respeito à quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o Q200.

É de notar que para este material de carbono temos um valor máximo de adsorção de 66,51 mg glucose/g MIP quando a concentração final é de 3,868 mg/mL. De destacar também que para este MIP não foi atingido um patamar de adsorção o que pode indicar que o Q200 pode continuar a adsorver glucose com o aumento da concentração de glucose.

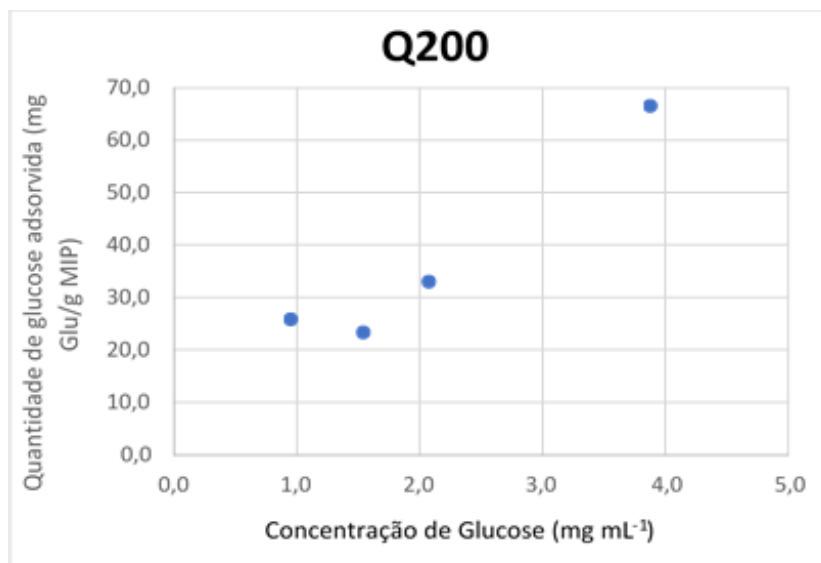


Figura 18 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o Q200.

A figura 19 diz respeito à quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o F200 0/+1.

É de notar que para este material compósito temos um valor máximo de adsorção de 126,55 mg glucose/g MIP quando a concentração final é de 2,662 mg/mL. De destacar também que os resultados mostram que se pode estar a atingir um patamar

de adsorção para este material compósito o que pode indicar que o F200 0/+1 pode continuar a adsorver glucose com o aumento da concentração de glucose.

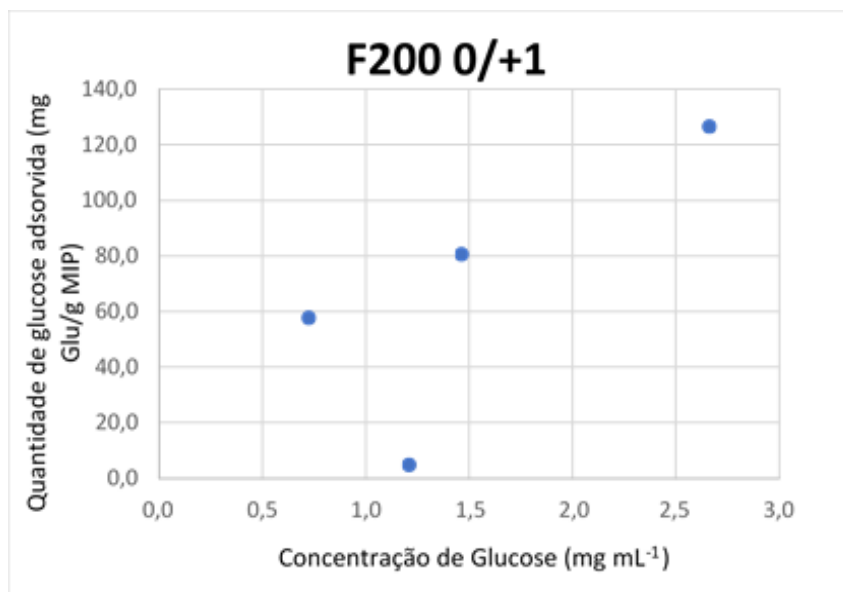


Figura 19 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o F200 0/+1.

A figura 20 diz respeito à quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o F200 +1/0.

É de notar que para este material compósito temos um valor máximo de adsorção de 106,16 mg glucose/g MIP quando a concentração final é de 0,948 mg/mL. De destacar também que este material tem no final do gráfico alguma dispersão, sendo que provavelmente o ponto experimental mais à direita não deve ser considerado. Neste caso, o mais provável é o material ter uma maior capacidade de adsorção da mostrada na figura 20 pois o valor 0,948 mg/mL é um valor muito pequeno.

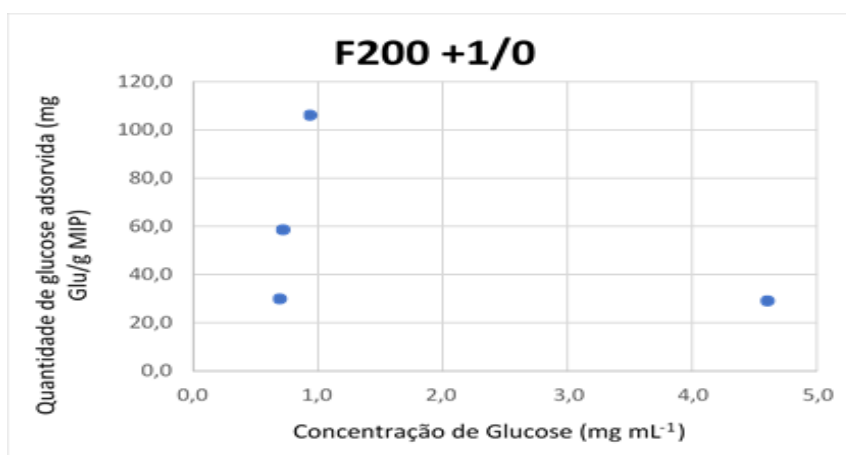


Figura 20 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o F200 +1/0.

A figura 21 diz respeito à quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o Q200 0/+1. É de notar que para este material compósito temos um valor máximo de adsorção de 41,67 mg glucose/g MIP quando a concentração final é de 5,698 mg/mL. De destacar também que os resultados mostram que se pode estar a atingir um patamar de adsorção para este material o que pode indicar que o Q200 0/+1 atingiu a sua capacidade máxima de adsorção de glucose quando a concentração de glucose chegou aos 5,698 mg/mL e que se se continuar a aumentar a concentração de glucose este MIP não irá adsorver mais.

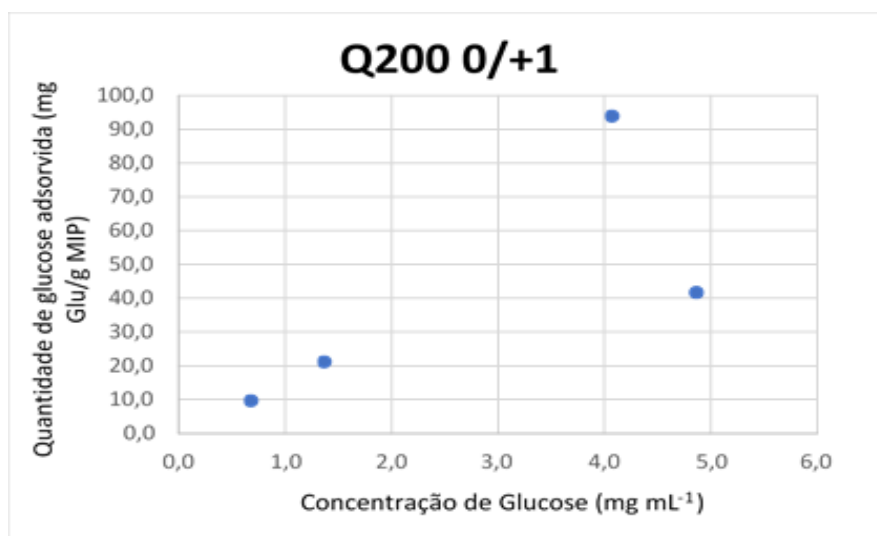


Figura 21 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o Q200 0/+1.

A figura 22 diz respeito à quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o Q200 +1/0. É de notar que para este material compósito temos um valor máximo de adsorção de 18,38 mg glucose/g MIP quando a concentração é de 5,330 mg/mL. De destacar também que para este MIP não foi atingido um patamar de adsorção o que pode indicar que o Q200 +1/0 pode continuar a adsorver glucose com o aumento da concentração de glucose.

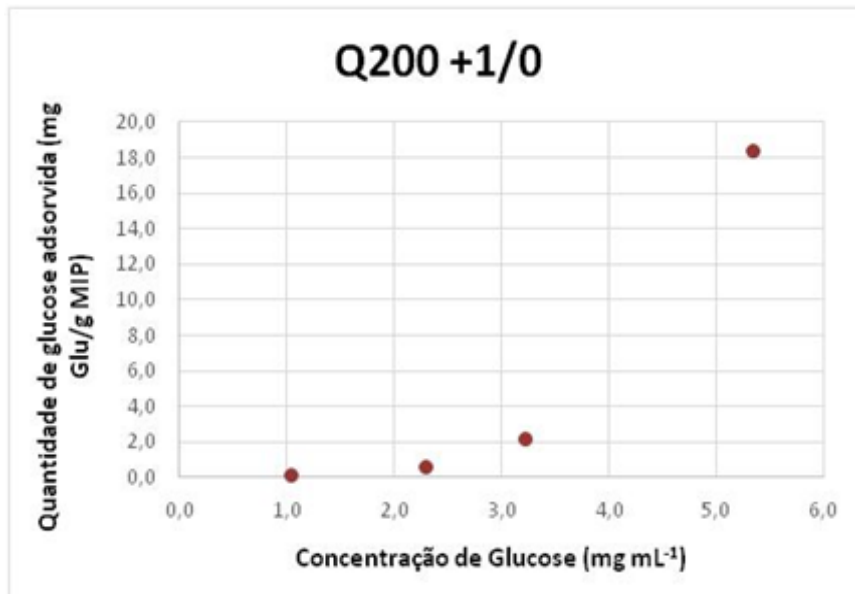


Figura 22 - Quantidade de glucose adsorvida em função da variação da concentração final de glucose para o Q200 +1/0.

Com base nos resultados obtidos podemos efetuar uma comparação entre os diversos materiais no que diz respeito à sua quantidade máxima para adsorver glucose, resultados mostrados nas figuras 23 e 24.

Foi também calculada a taxa máxima de remoção em percentagem para cada material, recorrendo ao valor inicial de concentração de glucose menos o valor final de concentração máximo de cada MIP e multiplicando-o por cem.

A figura 23 diz respeito aos valores de quantidade máxima de adsorção e percentagem de remoção para os MIP S, Q e U.

Como se pode observar pela figura, o MIP S foi o que apresentou uma maior quantidade máxima de adsorção (98,08 mg glu/g MIP) em relação aos MIP Q e U. No entanto, o MIP Q apresentou uma percentagem de remoção superior (50,50 %) em relação aos MIP S e U.

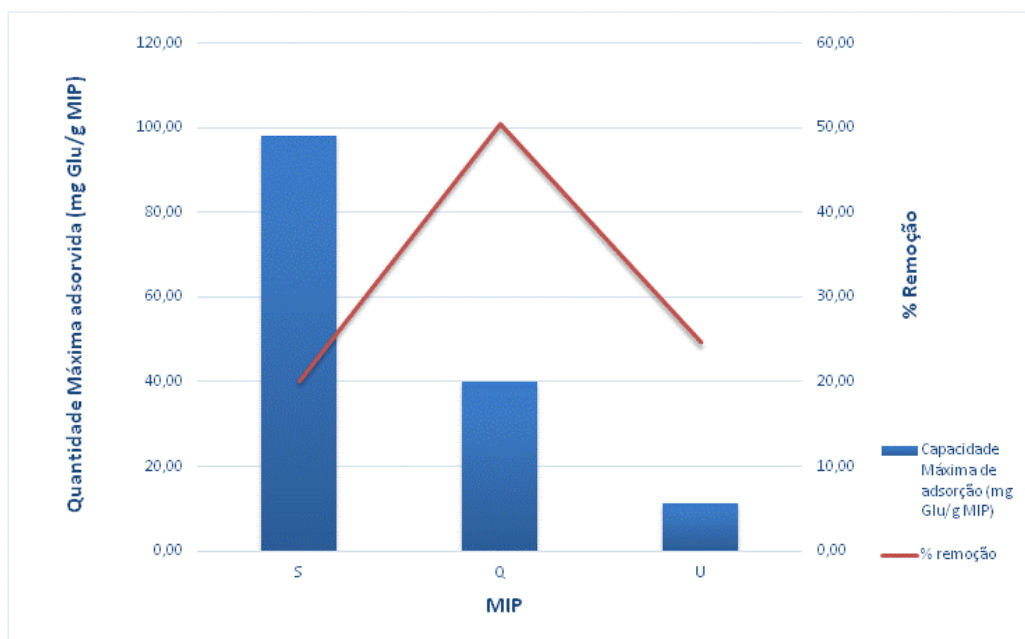


Figura 23 - Quantidade máxima adsorvida (mg Glu/g MIP) e Percentagem de remoção para os MIP S, Q e U.

A figura 24 diz respeito aos valores de quantidade máxima de adsorção e percentagem de remoção para os materiais F200, F200 0/+1, F200 +1/0, Q200, Q200 0/+1 e Q200 +1/0. Como se pode observar pela figura, a amostra F200 0/+1 foi a que apresentou uma maior quantidade máxima de adsorção (126,549 mg glu/g MIP) em relação aos MIP F200, F200 +1/0, Q200, Q200 0/+1 e Q200 +1/0. No entanto, o F200 +1/0 apresentou uma percentagem de remoção superior (68,41 %) em relação aos MIP F200, F200 0/+1, Q200, Q200 0/+1 e Q200 +1/0.

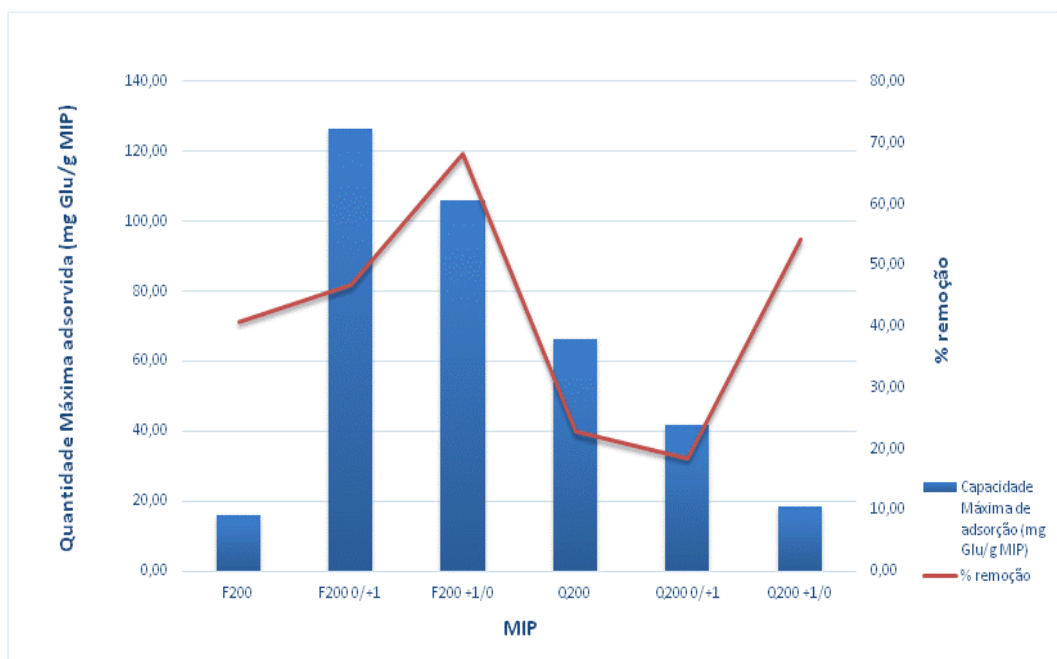


Figura 24 – Quantidade máxima adsorvida (mg Glu/g MIP) e Percentagem de remoção para os MIP F200, F200 0/+1, F200 +1/0, Q200, Q200 0/+1 e Q200 +1/0.

Dos resultados obtidos pode ser feita a comparação entre a quantidade máxima de adsorção e a percentagem de remoção para os três tipos de materiais utilizados (MIP, material de carbono e material compósito) (Figura 25). É possível observar que o material compósito F200 0/+1 é o material que apresenta uma quantidade máxima de adsorção e uma percentagem de remoção superiores aos restantes materiais.

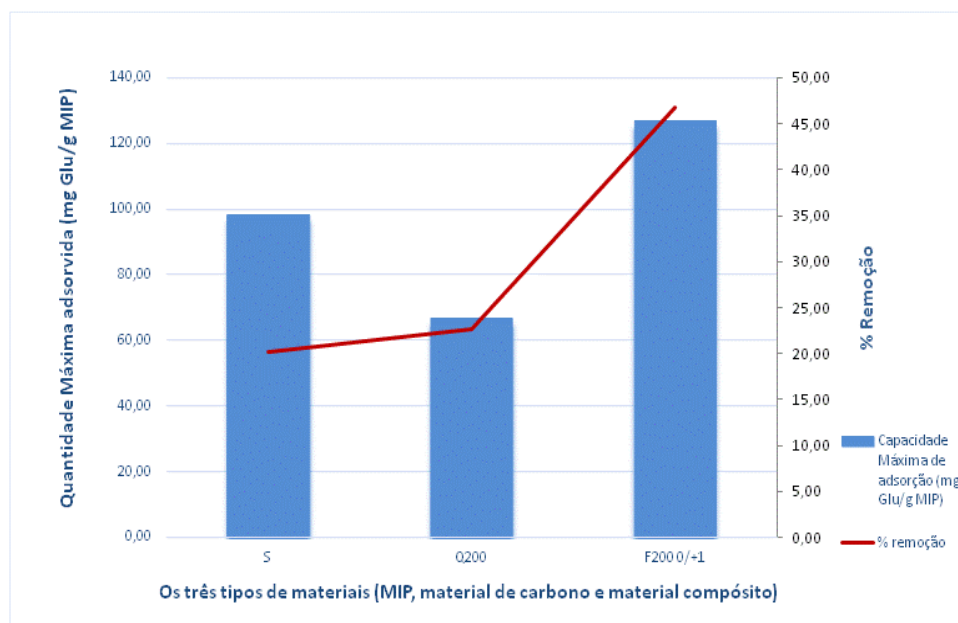


Figura 25 - Comparação da quantidade máxima adsorvida (mg Glu/g MIP) e percentagem de remoção entre os três materiais estudados.

Os resultados apresentados anteriormente parecem indicar que todos os materiais possuem alguma capacidade de adsorver glucose, em especial o material compósito F200 +1/0.

Contudo, existem materiais que atingem um patamar de adsorção e que se estima que se se aumentar a concentração de glucose estes materiais não tenham capacidade de adsorver mais glucose.

É importante salientar que podem ter ocorrido alguns erros experimentais. Eventualmente, esses erros experimentais estarão na origem da dispersão de resultados obtida, nomeadamente a evaporação de amostra que pode ocorrer durante a incubação das placas a aproximadamente 80 °C durante 1 hora e que as propriedades das moléculas poderão ser afetadas pelo ambiente.

## 4.2. Estudo do efeito dos materiais na viabilidade das células BRIN-BD11

Para o estudo do efeito dos materiais na viabilidade das células BRIN-BD11 foram utilizados os materiais compósitos F200 0/+1 e Q200 0/+1 por terem sido os materiais que apresentaram maior capacidade de adsorção de glucose (figura 24) e porque um dos objetivos era avaliar a potencialidade dos materiais compósitos, inovadores e originais, em relação ao seu uso clínico.

Uma vez que o método XTT se baseia na redução do XTT pelo NADH, para a realização deste estudo, primeiramente fomos avaliar a atividade desidrogenase das células em função da concentração de glucose ao fim de 24 horas (Figura 26). Para isso aplicámos diferentes concentrações de glucose que variaram entre 2,8 e 22,2 mM bem com ausência de glucose (G0). É de notar que quando as células estão expostas a um meio de cultura sem glucose estas não apresentam atividade desidrogenase. No entanto quando olhamos para a atividade com as diferentes concentrações podemos afirmar que quanto maior a concentração de glucose, no intervalo estudado, maior é a atividade metabólica das células, em conformidade com o descrito na literatura (Sigma Aldrich, 2005).

Note-se que nestes ensaios o nº de células/poço é constante.

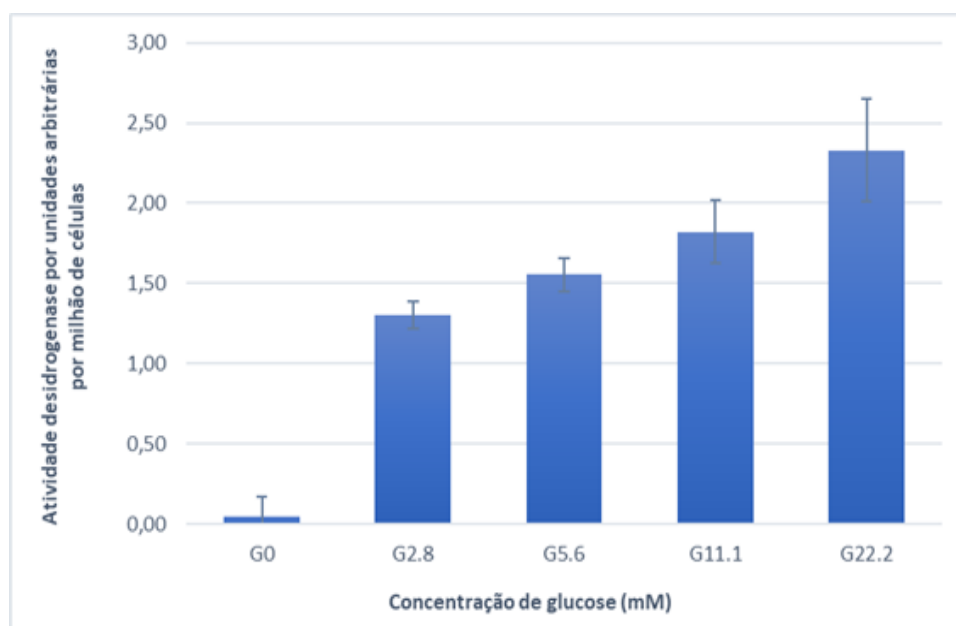


Figura 26 - Atividade desidrogenase por unidades arbitrárias por milhão de células em função da variação de glucose. Os pontos apresentados são correspondentes a triplicados.



Uma vez avaliada a atividade desidrogenase, fomos testar o efeito dos materiais na viabilidade celular. Desta forma foram realizados ensaios em que as células foram sujeitas a diferentes concentrações de glucose na ausência e na presença de materiais compósitos (F200 0/+1 e Q200 0/+1), tendo tido diferentes tempos de incubação (1h, 2h, 4h e 24h).

A figura 27 diz respeito aos ensaios de viabilidade celular. Neste ensaio as células parecem não apresentar diferenças na atividade desidrogenase com diferentes concentrações e tempos de incubação.

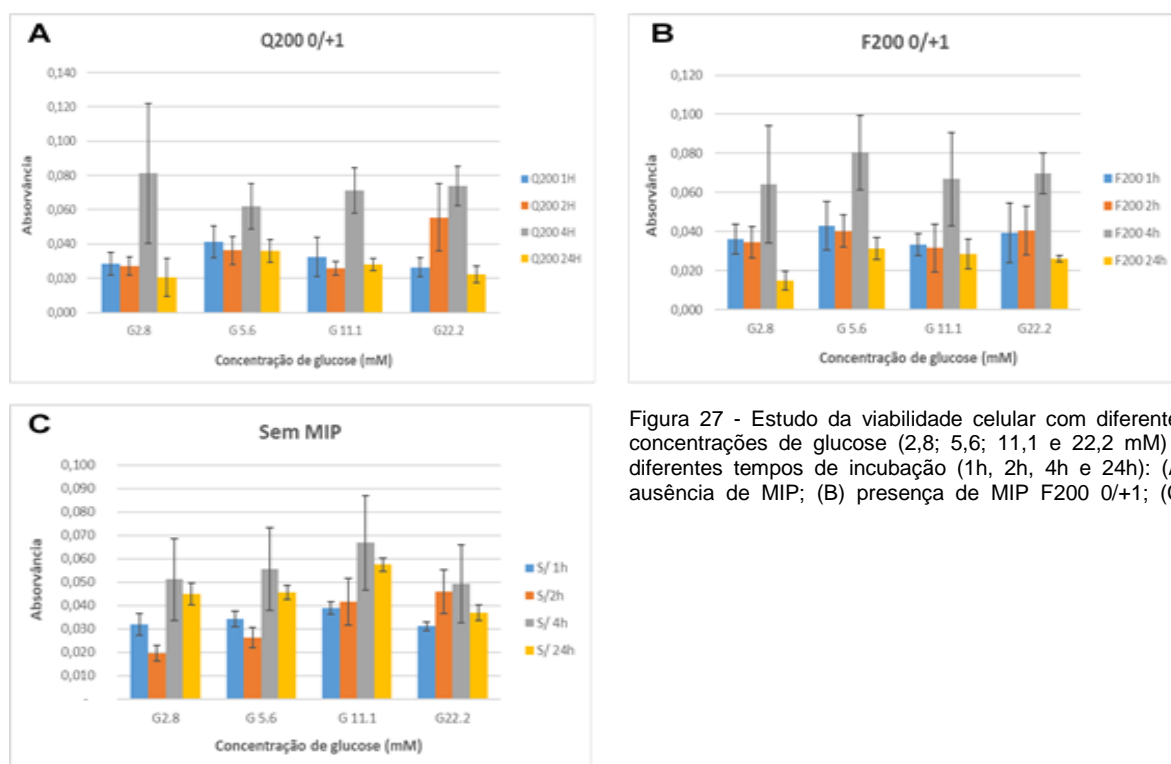


Figura 27 - Estudo da viabilidade celular com diferentes concentrações de glucose (2,8; 5,6; 11,1 e 22,2 mM) e diferentes tempos de incubação (1h, 2h, 4h e 24h): (A) ausência de MIP; (B) presença de MIP F200 0/+1; (C)

Os resultados apresentados anteriormente parecem indicar que a atividade desidrogenase aumenta com o aumento da concentração de glucose, no entanto quando realizamos ensaios de viabilidade celular com as concentrações usadas anteriormente, e com diferentes tempos de incubação parecem não existir diferenças na atividade das células. Os estudos realizados com os materiais compósitos parecem não afetar a viabilidade celular. No entanto estes resultados são apenas preliminares, uma vez que os materiais compósitos são compostos que não se dissolvem no meio ficando à superfície podendo desta forma interferir na leitura da absorvância (figura 28), o que explica a dispersão dos resultados obtidos. De facto, quando fizemos as medições observámos que existiam variações das leituras dos

diferentes replicados. Por isso, aquando da análise de resultados tivemos em atenção a disposição dos materiais compósitos nos diferentes brancos e os incubados com diferentes concentrações de glucose.

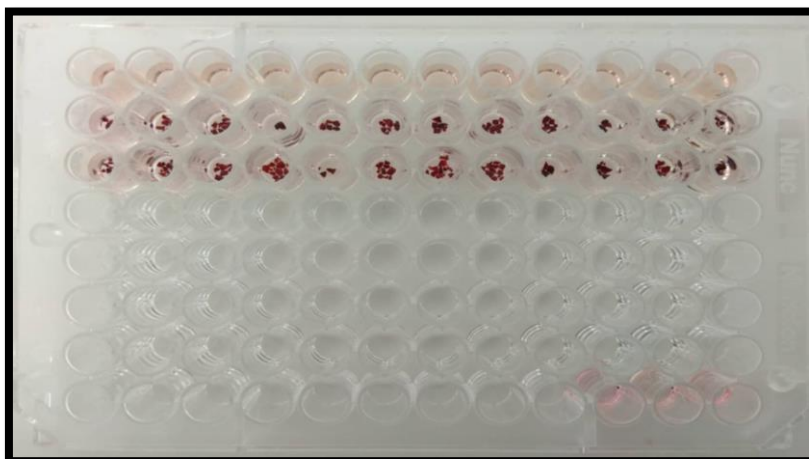


Figura 28 - Materiais compósitos, F200 0/+1 e Q200 0/+1, formando um filme à superfície do meio de cultura.

Devido ao facto de se ter observado que os materiais compósitos formavam um filme à superfície do meio de cultura, novas experiências foram realizadas. Os resultados seguintes são então respetivos aos novos ensaios onde foram retirados os materiais compósitos antes de se terem lido as absorvâncias das placas.

A figura 29 diz respeito aos ensaios de viabilidade celular. Com base nos resultados obtidos podemos observar que existe um aumento de metabolismo nas células que não estão em contato com os materiais compósitos. No caso das células que estão em contato com o F200 0/+1 e Q200 0/+1 observa-se que a taxa metabólica sofreu um decréscimo devido ao facto dos materiais compósitos adsorverem glucose o que faz com que a atividade das células diminua. Este efeito é observado com maior preponderância no meio G11.1 para 1 hora de incubação e nos meios G5.6 e G22.2 para 24 horas de incubação.

Observa-se também a inibição do próprio secretagogo no meio G22.2 há 1 e às 2 horas de incubação, onde se nota uma diminuição da atividade desidrogenase nas células. Este efeito é próprio das células uma vez que existe um excesso de glucose no meio.

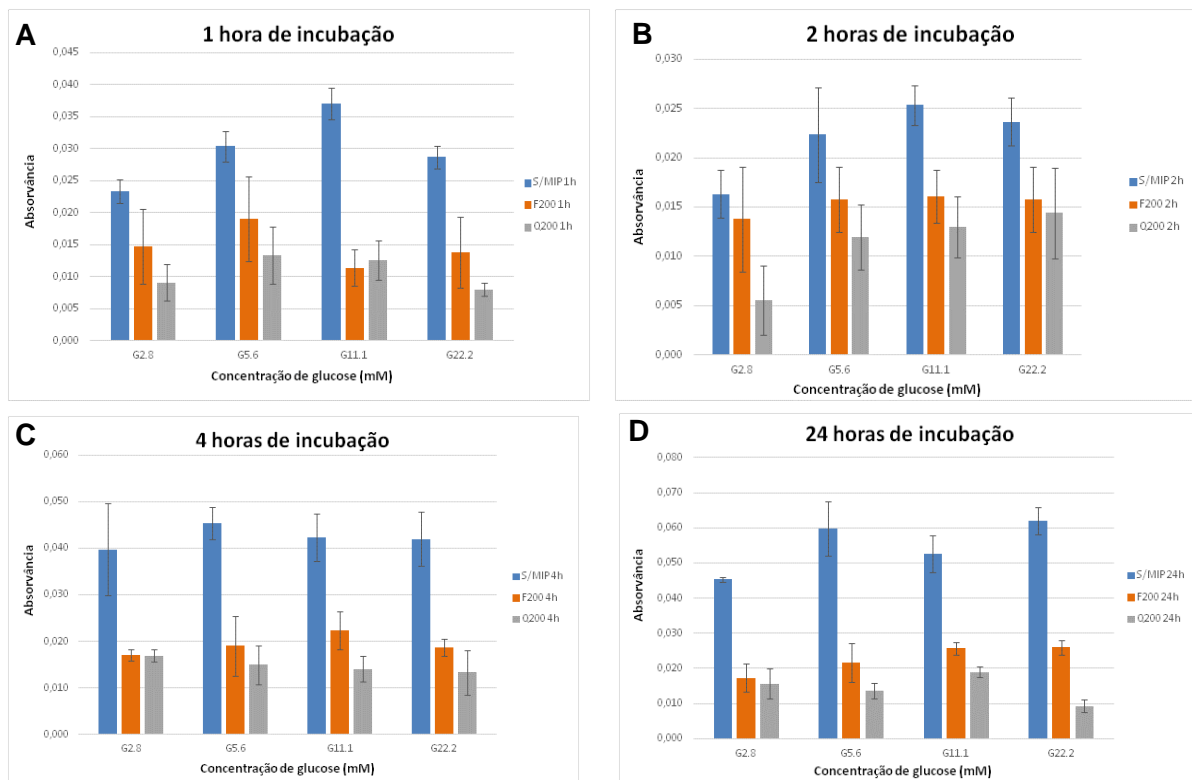


Figura 29 - Estudo da viabilidade celular com diferentes concentrações de glucose (2,8; 5,6; 11,1 e 22,2 mM) e diferentes tempos de incubação (1h, 2h, 4h e 24h): (A) 1 hora de incubação; (B) 2 horas de incubação; (C) 4 horas de incubação; (D) 24 horas de incubação.

Dos resultados obtidos pode ser feita uma comparação das diferentes percentagens de efeito entre os valores padrão e o material compósito (figura 30):

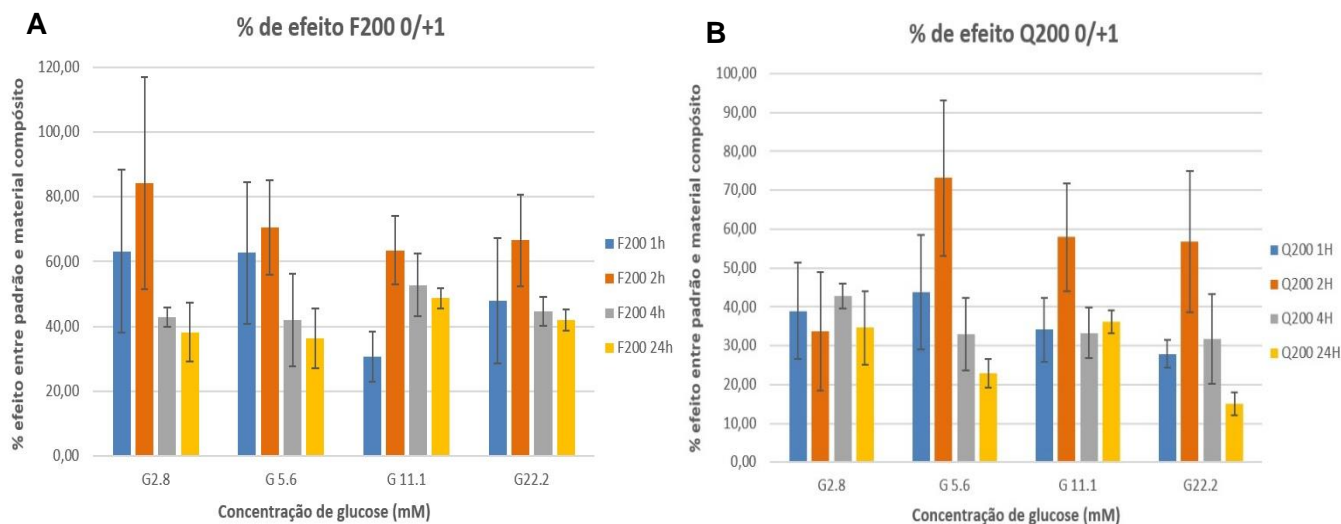


Figura 30 - Estudo da viabilidade celular com diferentes concentrações de glucose (2,8; 5,6; 11,1 e 22,2 mM) e diferentes percentagens de efeito entre os valores padrão e o material compósito: (A) presença de material compósito F200 0/+1; (B) presença de material compósito Q200 0/+1.

Os estudos realizados com os materiais compósitos parecem não afetar a viabilidade celular. No entanto, estes resultados são muito preliminares, e devido à elevada dispersão de valores entre réplicas são ainda inconclusivos. O facto de os materiais compósitos serem compostos que não se dissolvem no meio, formando um filme à superfície (figura 28), pode interferir na leitura da absorvância. Assim, neste ensaio pipetou-se o meio para uma nova placa tendo o cuidado para não se pipetar material compósito de forma a não haver interferência na leitura. Para além disso, registou-se ainda uma alteração da coloração do meio que sugere adsorção do corante vermelho de fenol e também do reagente XTT por parte dos materiais compósitos, uma vez que estes em contacto com o meio de cultura apresentam uma cor rosada (figura 31), quando em contacto com o reagente XTT reduzido apresentam uma cor acastanhada (figura 31) e quando em contacto com o XTT oxidado apresentam uma cor negra (figura 32). Assim, será importante repetir estas experiências recorrendo a um procedimento que permita ultrapassar estas limitações, onde se retire o meio dos materiais e depois se coloque o XTT para não se correr o risco de este ser complexado pelos materiais compósitos.

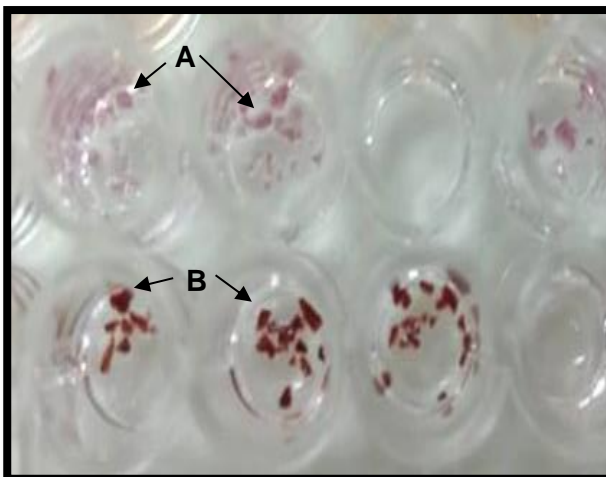


Figura 31 - Materiais compósitos, F200 0/+1 e Q200 0/+1, com cor rosada (A) e acastanhada (B) devido à adsorção de meio de cultura (A) e de reagente XTT (B).

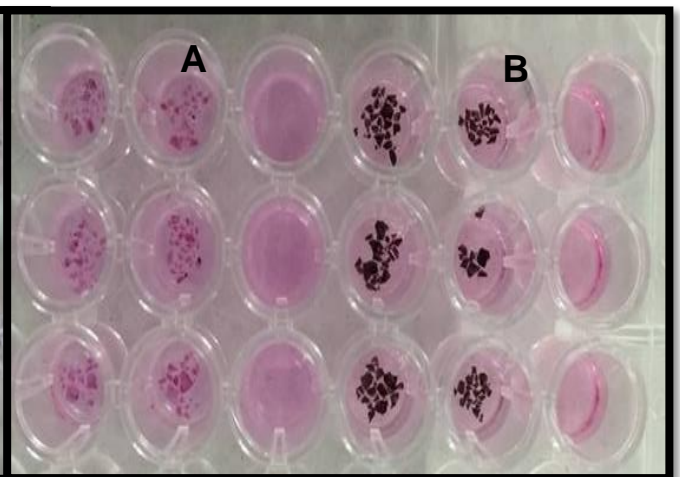


Figura 32 - Materiais compósitos, F200 0/+1 e Q200 0/+1, com cor rosada (A) e preta (B) devido à adsorção de meio de cultura (A) e

## V. Conclusões e Estudos Futuros

Este trabalho teve como objetivo estudar a capacidade para adsorver glucose de novos materiais híbridos produzidos através de metodologias de impressão molecular (MIPs) e avaliar a citotoxicidade desses novos materiais híbridos.

Neste sentido, os resultados obtidos e apresentados demonstraram que:

1. Todos os materiais estudados têm capacidade de adsorver glucose. No caso dos MIP de realçar o MIP S, o qual apresentou o valor mais elevado para a adsorção máxima (98,08 mg Glucose/g MIP). Em relação aos materiais de carbono de destacar o Q200 com o maior valor de adsorção máximo (66,51 mg Glucose/g MIP) e nos materiais compósitos o F200 0/+1 que apresentou a adsorção máxima de 126,55 mg Glucose/g MIP;
2. Existem materiais que atingem um patamar de adsorção e que se estima que se se aumentar a concentração de glucose estes MIP não tenham capacidade de adsorver mais glucose;
3. Todos os materiais têm capacidade de remover glucose do meio, em especial o material compósito F200 +1/0;
4. As células BRIN-BD11 apresentaram aumento de atividade desidrogenase com o aumento da concentração de glucose a que estão sujeitas, independentemente da duração do período de incubação (até 24h).
5. Embora os resultados sejam preliminares, os materiais estudados parecem não afetar a viabilidade celular em períodos de exposição de 1 a 24h.
6. No caso das células que estão em contato com o F200 0/+1 e Q200 0/+1 observa-se que a taxa metabólica sofreu um decréscimo devido ao facto dos materiais compósitos adsorverem glucose o que faz com que a atividade das células diminua. Este efeito é observado com maior preponderância no meio G11.1 para 1 hora de incubação e nos meios G5.6 e G22.2 para 24 horas de incubação.
7. Observa-se a inibição do próprio secretagogo no meio G22.2 para a 1 e 2 horas de incubação, onde se nota uma diminuição da atividade desidrogenase nas células. Este efeito é próprio das células uma vez que existe um excesso de glucose no meio.

Tendo em consideração os resultados obtidos e apesar de o objetivo do trabalho ter sido alcançado, surgiram várias questões ao longo deste estudo. De seguida apresentam-se alguns tópicos de interesse que podem vir a ser alvo de estudo no futuro:

- estudar a utilização de outras concentrações de glucose;
- aplicação de um método diferente de quantificação;
- repetir a experiência de viabilidade celular procurando retirar-se o meio dos materiais e depois se coloque o XTT para não se correr o risco de este ser complexado pelos materiais compósitos.

## VI. Bibliografia

- AccessMedicine. (2014). Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine, 7e | AccessMedicine | McGraw-Hill Medical. Retrieved from <http://accessmedicine.mhmedical.com.ezproxy.unal.edu.co/book.aspx?bookid=961>
- Anacleto, S. da S., de Oliveira, H. L., da Silva, A. T. M., do Nascimento, T. A., & Borges, K. B. (2017). Preparation of an organic–inorganic hybrid molecularly imprinted polymer for effective removal of albendazole sulfoxide enantiomers from aqueous medium. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(6), 6179–6187. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.049>
- Arshady, R. ; Mosbach, K. (1981). Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Macromol Chem Phys*, (182), 687–692. <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>
- Ayankojo, A. G., Reut, J., Öpik, A., Furchner, A., & Syritski, V. (2018). Hybrid molecularly imprinted polymer for amoxicillin detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 118(June), 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.042>
- Bakkar, M. M. (2012). An investigation of solution-induced corneal staining using an in vitro model A thesis submitted to the University of Manchester for the degree of Doctor of Philosophy ( PhD ) in the Faculty of Life Sciences.
- Cormack, P. A. G., & Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 804(1), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>
- Deshmukh, K., Singh, Y., Pravin, T., & Cavalli, S. R. (2015). Biomimetic estimation of glucose using non-molecular and molecular imprinted polymer nanosponges. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(1), 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.022>
- DICKEY, F. H. (1952). The Preparation of Specific Adsorbants. *Journal of the American Chemical Society*, 74(19), 4946–4947. <https://doi.org/10.1021/ja01139a503>
- Dr. Arthur Frazão. (2007). Quando o diabético deve tomar insulina - Tua Saúde.

- Retrieved April 20, 2018, from <https://www.tuasaude.com/quando-o-diabetico-deve-tomar-insulina/>
- Essays, U. (2013). Importance of Cell Cultures. Retrieved July 18, 2018, from <https://www.ukessays.com/essays/biology/importance-cell-cultures-5193.php?vref=1>
- Figueiredo, E. C., Dias, A. C. B., & Arruda, M. A. Z. (2008). Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(3), 361–375. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300005>
- Fumes, B. H., Silva, M. R., Andrade, F. N., Nazario, C. E. D., & Lanças, F. M. (2015). Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.011>
- Haupt, K. (2001). Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *Analyst*, 126(6), 747–756. <https://doi.org/10.1039/b102799a>
- He, Z.-X., Zhou, Z.-W., Yang, Y., Yang, T., Pan, S.-Y., Qiu, J.-X., & Zhou, S.-F. (2015). Overview of clinically approved oral antidiabetic agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(2), 125–138. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12332>
- Huang, C., Qian, X., & Yang, R. (2018). Thermal conductivity of polymers and polymer nanocomposites. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 132(May), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2018.06.002>
- IDF. (2017). *IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation*. <https://doi.org/10.1289/image.ehp.v119.i03>
- Knowler, W. C., Barrett-Connor, E., SE, F., RF, H., JM, L., EA, W., & DM, N. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin, 346(6), 393–403. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012512>
- Laginhas, C., Nabais, J. M. V., & Titirici, M. M. (2016). Activated carbons with high nitrogen content by a combination of hydrothermal carbonization with activation. *Microporous and Mesoporous Materials*, 226, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.12.047>
- Leitão, G. sampaio ferreira. (2014). DESENVOLVIMENTO DE UM POLÍMERO



IMPRESSO MOLECULARMENTE PARA ANÁLISE DE GALAXOLIDE EM MATRIZES AMBIENTAIS, 54.

- Luk, Y., J., A., & Wirth, T. (2010). Molecular imprinted polymers binding low functionality templates. *Tetrahedron Letters*, 51(45), 5883–5885. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.08.108>
- M. Penga, Haiyan Xiang, Xin Hu, Shuyun Shi, & Xiaoqing Chen. (2016). Boronate affinity-based surface molecularly imprinted polymers using glucose as fragment template for excellent recognition of glucosides. *Journal of Chromatography A*, 1474, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.059>
- Macedo, M. D. De. (2014). Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de Mycoplasma spp . em culturas celulares Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de Mycoplasma spp . em culturas celulares.
- Madikizela, L. M., Zunngu, S. S., Mlunguza, N. Y., Tavengwa, N. T., Mdluli, P. S., & Chimuka, L. (2018). Application of molecularly imprinted polymer designed for the selective extraction of ketoprofen from wastewater. *Water SA*, 44(3), 406–418. <https://doi.org/10.4314/wsa.v44i3.08>
- Manual, I. (1988). XTT Cell Proliferation Assay Kit by Cellular Enzymes, (30), 6.
- McClenaghan, N., Barnett, C., Ah-Sing, E., Abdel-Wahab, Y., O'Harte, F., Yoon, T., ... Flatt, P. (1996). Characterisation of a novel glucose-responsive insulin-secreting cell line, BRIN-BD11, produced by electrofusion. *Diabetes*, 45(September), 1132–1140. <https://doi.org/10.2337/diab.45.8.1132>
- McClenaghan, N. H., & Flatt, P. R. (1999). Engineering cultured insulin-secreting pancreatic B-cell lines. *Journal of Molecular Medicine*, 77(1), 235–243. <https://doi.org/10.1007/s001090050344>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Parmpi, P., & Kofinas, P. (2004). Biomimetic glucose recognition using molecularly imprinted polymer hydrogels. *Biomaterials*, 25(10), 1969–1973. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.025>
- Pauling, L. (1940). A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies. *Journal of the American Chemical Society*, 62(10), 2643–2657.

<https://doi.org/10.1021/ja01867a018>

- Pichon, V., & Chapuis-Hugon, F. (2008). Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants-A review. *Analytica Chimica Acta*, 622(1–2), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.057>
- Piletsky, S. a, Alcock, S., & Turner, a P. F. (2001). Molecular imprinting: at the edge of the third millenium. *Trends Biotechn*, 19(1), 9–12.
- Procedure, L. P. (2011). Gago-20 glucose assay kit Technical Bulletin. *Ratio*, 1–7.
- Santos, A. A. dos, Deoti, J. R., Müller, G., Dário, M. G., Stambuk, B. U., & Alves Junior, S. L. (2017). Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20(0). <https://doi.org/10.1590/1981-6723.11315>
- Santos, M. G., Abrão, L. C. C., Freitas, L. A. S., Moraes, G. O. I., Lima, M. M., & Figueiredo, E. C. (2012). Molecularly imprinted polymers in sample preparation for organic compounds analysis: applications and trends. *Scientia Chromatographica*, 4(3), 161–195. <https://doi.org/10.4322/sc.2012.012>
- Scudiero, D. a, Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Scudiere, D. a, Paul, K. D., Monks, A., ... Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human an, 4827–4833.
- Sigma Aldrich. (2005). Product Information, 3. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1150-7>
- Tan, J., Guo, M., Tan, L., Geng, Y., Huang, S., Tang, Y., ... Liang, Y. (2018). Highly efficient fluorescent QDs sensor for specific detection of protein through double recognition of hybrid aptamer-molecular imprinted polymers. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 274(July), 627–635. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.126>
- Tarley, C. R. T., Sotomayor, M. D. P. T., & Kubota, L. T. (2005). POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS EM QUÍMICA ANALÍTICA. PARTE 1: PREPARO E APLICAÇÕES DE MIP (“MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS”) EM TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO César Ricardo Teixeira Tarley, Maria Del Pilar Taboada Sotomayor e Lauro Tatsuo Kubota\*, 28(6), 1076–1086.

- Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P., & Vulfson, E. N. (1995). A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. *Journal of the American Chemical Society*, *117*(27), 7105–7111. <https://doi.org/10.1021/ja00132a010>
- WHO | Diabetes programme. (2017). WHO. Retrieved from <http://www.who.int/diabetes/en/>
- WHO | The top 10 causes of death. (2017). WHO. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Wulff, G., Sarhan, A., Gimpel, J., & Lohmar, E. (1974). Über enzymanalog gebaute Polymere, III. Zur Synthese von polymerisierbaren D-Glycerinsäurederivaten. *Chemische Berichte*, *107*(10), 3364–3376. <https://doi.org/10.1002/cber.19741071022>
- Yang, Y., Yi, C., Luo, J., Liu, R., Liu, J., Jiang, J., & Liu, X. (2011). Glucose sensors based on electrodeposition of molecularly imprinted polymeric micelles: A novel strategy for MIP sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(5), 2607–2612. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.11.015>

## VII. Anexos

### Lista de Reagentes

- BSA (Sigma Aldrich);
- Etanol (VWR);
- H<sub>2</sub>O destilada e bi-destilada;
- NaCl (Sigma-Aldrich);
- KCl (Sigma-Aldrich);
- HEPES (Sigma-Aldrich);
- NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich);
- CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich);
- MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich);
- KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich);
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich);
- NaOH (Sigma-Aldrich);
- XTT solution (Biotium);
- Activation Reagent PMS (Biotium);
- Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich);
- Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (PRS Panreac);
- Glucose (Sigma-Aldrich);
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich);

## Lista de Materiais

- Balões volumétricos;
- Esguicho;
- Espátulas
- Etiquetas
- Frascos de cultura celular;
- Gelo;
- Gobelés;
- Luvas descartáveis;
- Magnetes;
- Microplacas;
- Microtubos estéreis e não-estéreis;
- Micropipetas P10, P20, P100, P200, P1000, P5000 e respectivas pontas;
- Tubos de falcon (15 e 50 mL);
- Placas de 96 poços para cultura de células;
- Placas de 96 poços;
- Pinças;
- Micropipeta multicanal;
- Parafilme;

## **Lista de equipamentos**

- Agitador magnético (Labinco);
- Balança Analítica (Metler HK 160)
- Câmara de fluxo laminar (Nuair)
- Centrifuga de bancada (*spin*) (Clever Scientific Ltd)
- Centrifuga (Hettich zentrifugen)
- Congelador
- Medidor de pH: Inolab pH Level 1
- Microscópio ótico (Olympus)
- Leitor de microplacas
- Rotador (Rotador Drive STR4)

## **Técnicas Utilizadas**

- Glucose (GO) *Assay Kit*;
- Método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS);
- Cultura Celular;
- Centrifugação;
- XTT *Assay Kit*;

## **Preparação de Soluções**

### *Quantificação de açúcares redutores*

#### **Preparação do kit de ensaio de Glucose (G0)**

##### **Reagente de glucose oxidase/peroxidase**

Para 39,2 mL de solução glucose oxidase/peroxidase dissolver o conteúdo da cápsula num frasco âmbar com 39,2 ml de água desionizada.

Nota: Cada cápsula contém 500 unidades de glicose oxidase (*Aspergillus niger*), 100 unidades de purpurogalina da peroxidase (rábano silvestre) e sais tampão.

##### **Reagente o-Dianisidina**

Reconstruir o conteúdo do frasco de o-Dianisidina (5 mg de dicloridrato de o-dianisidina) com 1,0 mL de água desionizada. Inverter o frasco várias vezes até dissolução total do conteúdo.

##### **Reagente de Ensaio**

Para 40 mL de reagente de ensaio adicionar 0,8 mL de o-Dianisidina ao frasco contendo 39,2 mL de glucose oxidase/peroxidase. Inverter o frasco até dissolução total do conteúdo.

##### **Solução padrão de glucose**

Conteúdo do frasco:

- D-Glucose - 1,0 mg / mL em ácido benzoico a 0,1%. Este padrão é rastreável a um padrão NIST e é fornecido pronto a usar.

##### **Reagente necessário, mas não fornecido – Ácido Sulfúrico**

Para preparar 12 N de solução de ácido sulfúrico em água desionizada pipetar 16 mL de solução de ácido sulfúrico 95-97% para um balão de vidro contendo 34 mL de água desionizada, lentamente através de uma pipeta de plástico até perfazer o volume de solução.

### **Preparação do método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)**

#### **Solução Tampão Krebs-Ringer-fosfato pH 7:**

Para 100 mL de solução Krebs adicionar:

- 10 mM HEPES (ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic);
- 120 mM NaCl;
- 5 mM KCl;
- 25 mM NaHCO<sub>3</sub>;

Após mistura por agitação dos reagentes acima descritos adicionar 2,6 mM de CaCl<sub>2</sub> e 1,3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

#### **Solução de DNS**

Para 100 mL de solução DNS dissolver 1g de ácido di-nitrito-salicílico em 20mL de NaOH 2 M (1,6 g de NaOH para 20 mL de ácido) a banho maria e com agitação. De seguida dissolver 30g de Tartarato de Potássio e Sódio em 60 mL de água destilada com agitação. Por último misturar-se as duas soluções a banho maria e com agitação manual e perfazer o volume a 100 mL num balão com água destilada.



## **Preparação do kit de ensaio XTT**

### **Versénio**

- 136,9 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 2,707 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,55 mM EDTA

### **Meio de cultura RPMI**

- 10 g/L de meio
- 2,6 g/L  $\text{NaHCO}_3$
- 1% de antibiótico penstrep
- 10% de FBS

### **Solução de XTT**

- Reagente XTT 5,0 mL
- Reagente de ativação 0,5 mL