



Sensor Eletroquímico Seletivo para a Norfloxacinina

JOANA ISABEL PIMENTA DA SILVA

Outubro de 2013

Dissertação de Mestrado

Sensor eletroquímico seletivo para a Norfloxacin

Joana Isabel Pimenta Da Silva

joanaipsilva89@gmail.com

Tese de Mestrado

Outubro de 2013

Orientador(es) no ISEP

Professora Doutora Cristina Delerue - Matos

Doutor João Pacheco

Mestrado em

Engenharia de Computação e Instrumentação Médica

Departamento de Física – ISEP

Instituto Superior de Engenharia do Porto

Porto, Portugal

A Deus, à família, aos amigos, colegas de trabalho e orientadores.

Por todo o amor, apoio, incentivo, amizade, paciência e força.

Resumo

A Norfloxacin (NFX) é um antibiótico antibacteriano indicado para combater bactérias Gram-negativas e amplamente utilizado para o tratamento de infeções no trato respiratório e urinário. Com a necessidade de realizar estudos clínicos e farmacológicos desenvolveram-se métodos de análise rápida e sensível para a determinação da Norfloxacin.

Neste trabalho foi desenvolvido um novo sensor eletroquímico sensível e seletivo para a deteção da NFX. O sensor foi construído a partir de modificações efetuadas num elétrodo de carbono vítreo. Inicialmente o elétrodo foi modificado com a deposição de uma suspensão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) de modo a aumentar a sensibilidade de resposta analítica. De seguida um filme polimérico molecularmente impresso (MIP) foi preparado por eletrodeposição, a partir de uma solução contendo pirrol (monómero funcional) e NFX (template). Um elétrodo de controlo não impresso foi também preparado (NIP). Estudou-se e caracterizou-se a resposta eletroquímica do sensor para a oxidação da NFX por voltametria de onda quadrada. Foram otimizados diversos parâmetros experimentais, tais como, condições ótimas de polimerização, condições de incubação e condições de extração.

O sensor apresenta um comportamento linear entre a intensidade da corrente do pico e o logaritmo da concentração de NFX na gama entre 0,1 e 8 μ M. Os resultados obtidos apresentam boa precisão, com repetibilidade inferior a 6% e reprodutibilidade inferior a 9%. Foi calculado a partir da curva de calibração um limite de deteção de 0,2 μ M.

O método desenvolvido é seletivo, rápido e de fácil manuseamento. O sensor molecularmente impresso foi aplicado com sucesso na deteção da NFX em amostras de urina real e água.

Palavras-Chave: Norfloxacin, Sensor, Eletroquímica, Polímero Molecularmente Impresso, Nanotubos de Carbono.

Abstract

Norfloxacin (NFX) is an antibacterian antibiotic indicated to resist gram- negative bacteria's and it's used to treat urinary infections and respiratory infections.

In this study a new sensitive and selective electrochemical sensor to detect NFX was developed. The sensor was fabricated from modifications on glassy carbon electrode. Firstly, the electrode was modiflicated by deposition of a suspension of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) to raise the sensibility of an analytical response. Subsequently a molecular imprinted film (MIP) was prepared by electrodeposition, from a solution containing pyrrole (functional monomer) and NFX (template). A control non imprinted electrode (NIP) without the template NFX was also prepared. The electrochemical response of sensor to the oxidation of NFX by square wave voltammetry (SWV) was characterized. Several experimental parameters, such as, polymerization, incubation and extraction conditions were studied and optimized.

The sensor presented a linear behavior, between peak current intensity and logarithm concentration of NFX in range between 0.1 and 8 μM . The obtained results present a good precision, with repeatability less than 6 % and reproducibility less than 9 %. A detection limit of 0, 2 μM was calculated from the calibration curve.

The developed method is selective, fast and easy to operate. It was successfully applied in the detection of NFX in urine and water samples.

Keywords: Norfloxacin, Sensor, electrochemical, molecular imprinted film, carbon nanotubes.

Agradecimentos

À professora Doutora Cristina por me ter acolhido no seu laboratório, por toda a dedicação, atenção, apoio prestado e amizade.

Ao Doutor João Pacheco pela atenção, dedicação, apoio prestado e por toda a informação que me passou durante este ano letivo.

Ao professor Carlos Ramos, pelo ótimo desempenho como diretor de mestrado e por ser um bom ouvinte.

Aos meus colegas de laboratório e ao meu colega Hélder Filipe por toda a ajuda fornecida durante o período de ensaios laboratoriais e pela amizade demonstrada.

Aos meus amigos pela paciência demonstrada e pelo apoio para avançar nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, à minha irmã, ao meu namorado, à minha afilhada, que são o suporte para que tenha concluído mais uma etapa da minha vida.

Índice

1	Introdução Teórica.....	1
1.1	Medicamentos de uso humano	1
1.1.1	Farmacocinética	3
1.1.2	Antibióticos	5
1.1.3	Norfloxacina.....	7
1.2	Sensores.....	8
1.2.1	Sensores eletroquímicos	10
1.3	Polímeros Molecularmente impressos (MIPs)	11
1.4	Técnicas voltamétricas	13
1.4.1	Célula eletroquímica	18
1.4.2	Elétrodo de carbono vítreo	18
1.4.3	Elétrodo de carbono vítreo modificados	19
1.4.3.1	Modificação com polímeros - pirrol.....	20
1.4.3.2	Modificação para amplificar o sinal analítico – nanotubos de carbono	21
2	Parte Experimental	25
2.1	Equipamento.....	25
2.2	Reagentes e soluções	26
2.3	Preparação do sensor	27
2.3.1	Limpeza dos eléctrodos	27
2.3.2	Deposição de Nanotubos de Carbono de paredes Múltiplas (MWNT).....	28
2.3.3	Preparação Polímero Molecularmente Impresso (MIP)	28
2.3.4	Preparação Polímero Não Molecularmente Impresso (NIP)	30
2.4	Medições Electroquímicas	30
2.5	Preparação das Amostras.....	31
3	Resultados e Discussão.....	33
3.1	Limpeza do elétrodo de trabalho (carbono vítreo)	33
3.2	Preparação do Mip e Nip.....	34
3.3	Comportamento eletroquímico e otimização do sensor	38
3.3.1	Deteção voltamétrica da NFX	38
3.3.2	Tempo de incubação.....	42
3.3.3	Tempo de remoção	44

3.4	Performance Analítica	46
3.4.1	Curva de Calibração	46
3.4.2	Repetibilidade	47
3.4.3	Reprodutibilidade	49
3.5	Aplicação em Amostras Reais	49
3.5.1	Aplicação em Amostras de Urina	50
3.5.2	Aplicação em Amostras de Água	53
4	Conclusões	57

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Percurso de um medicamento até à sua utilização.....	1
Figura 1.2 – Percurso de um medicamento até à sua utilização.....	4
Figura 1.3 – Molécula de Norfloxacin.....	8
Figura 1.4 – Esquema da construção de um sensor.....	9
Figura 1.5 – Características de um sensor eletroquímico.	10
Figura 1.6 – Edificação de um MIP.	11
Figura 1.7 –Esquema de uma voltametria cíclica.	14
Figura 1.8 – Esquema da voltametria de pulso normal.	15
Figura 1.9 – Esquema da voltametria de pulso diferencial.	16
Figura 1.10 – Esquema da voltametria de onda quadrada.....	17
Figura 1.11 – Polimerização oxidativa do monómero pirrol.	20
Figura 1.12 – Nanotubo de carbono de paredes simples do tipo <i>amchair</i> , <i>zig-zag</i> e <i>chiral</i>	22
Figura 1.13 – Descrição computacional de um nanotubo de carbono de paredes múltiplas e de um nanotubo de carbono de paredes simples.	23
Figura 2.1– Fotografia do Autolab utilizado.....	25
Figura 2.2– Esquema da preparação do sensor.	27
Figura 3.1– Voltamograma cíclico de uma limpeza eletroquímica de um eletrodo de carbono vítreo em H ₂ SO ₄ , obtido ao fim de 20 ciclos. Gama de potenciais: -0,2 a 1,6 V; Velocidade de varrimento: 100mV/s.	34
Figura 3.2 – Preparação do MIP por eletropolimerização. Número de ciclos: 10; Gama de potenciais -0,2 a 1,3V; Velocidade de varrimento: 100mV/s; Solução de polimerização: 0,5M H ₂ SO ₄ , 10mM pirrol, 10mM Norfloxacin em água/acetoneitrilo (50:50).....	35
Figura 3.3 – Voltamogramas cíclicos finais da polimerização do MIP e NIP: Número de ciclos: 10; Gama de potenciais 0,0 V a 1,3 V; Velocidade de varrimento: 100mV/s.	36
Figura 3.4– Sobreoxidação do MIP após polimerização: Número de ciclos: 10; Gama de potenciais 0,0 V a 1,3 V; Velocidade de varrimento: 100mV/s; eletrólito de suporte: tampão PBS 0,1 M pH=4.....	37
Figura 3.5– Voltamogramas obtidos para o MIP e NIP após 10 min de incubação numa solução de NFX 1mM. Eletrólito de Suporte: H ₂ SO ₄ 0,1M; Voltametria de onda quadrada a 25Hz. ..	39
Figura 3.6– Voltamogramas obtidos para sensores com e sem MWCNT após 10 min de incubação numa solução de NFX 1mM. Eletrólito de Suporte: PBS 0,1M pH 4; Voltametria de onda quadrada a 25Hz.....	40

Figura 3.7– Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do número de deposições de MWCNT. 10 Minutos de incubação numa solução de NFX 1mM; Eletrólito de Suporte: PBS 0,1M pH 4; Voltametria de onda quadrada a 25Hz.	42
Figura 3.8– Voltamogramas obtidos na incubação em diferentes períodos de tempo numa solução de NFX 1mM. Eletrólito de Suporte: PBS 0,1M pH 4; Voltametria de onda quadrada a 25Hz.	43
Figura 3.9– Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do tempo de incubação numa solução de NFX 1mM.	44
Figura 3.10– Gráfico da variação da intensidade do pico em função do tempo de remoção em solvente, após 10 minutos de incubação numa solução de NFX 1mM.	45
Figura 3.11– Representação da intensidade do pico em função da concentração de NFX nas condições de análise otimizadas.....	46
Figura 3.12– Representação da curva de calibração logaritmica nas condições de análise otimizadas.....	47
Figura 3.13– Voltamogramas relativos aos ensaios de repetibilidade realizados com 2 sensores.....	48
Figura 3.14– Gráfico da variação % de recuperação de uma solução de NFX 1mM em função da presença de interferentes com uma concentração 10 vezes superior.	51
Figura 3.15– Voltamogramas relativos à aplicação do sensor na deteção de NFX numa amostra de urina.....	53
Figura 3.16– Voltamogramas relativos à aplicação do sensor na deteção de NFX numa amostra de água de torneira pública.....	54
Figura 3.17– Voltamogramas relativos à aplicação do sensor na deteção de NFX numa amostra de água de rio.	54

Lista de Tabelas

Tabela 2.1— Solução usada na eletropolimerização para obtenção do MIP	28
Tabela 2.2— Condições voltamétricas usadas na eletropolimerização do MIP	29
Tabela 2.3— Condições de sobreoxidação	29
Tabela 2.4— Solução usada na eletropolimerização para obtenção do NIP	30
Tabela 2.5— Condições voltamétricas usadas na eletropolimerização do MIP	30
Tabela 3.1— Ensaio de repetibilidade.....	48
Tabela 3.2— Ensaio de reprodutibilidade	49

Acrónimos e Símbolos

AIM	<i>Autorização de Introdução no Mercado</i>
C	<i>Carbono</i>
DME	<i>Eletrodo gotejante de mercúrio</i>
E	<i>Potencial</i>
Epa	<i>Potencial de pico anódico</i>
Epc	<i>Potencial de pico catódico</i>
FSO	<i>Valor da escala completa</i>
GI	<i>Gastro intestinal</i>
HPLC	<i>Cromatografia Líquida de alta eficiência</i>
Hz	<i>Hertz</i>
LOQ	<i>limite de quantificação</i>
LOD	<i>limite de detecção</i>
MIP	<i>Polímero molecularmente impresso</i>
MWCNT	<i>Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas</i>
CN	<i>Nanotubo de Carbono</i>
NFX	<i>Norfloxacin</i>
NIP	<i>Polímero não molecularmente impresso</i>
DPV	<i>Voltametria de Pulso Diferencial</i>
PPy	<i>Polipirrol</i>
PS	<i>Poli(estireno)</i>
PVA	<i>Álcool polivinílico</i>

rpm	<i>Rotações por minuto</i>
RVC	<i>Carbono Vítreo Reticulado</i>
SWCNT	<i>Nanotubos de Carbono de Paredes Simples</i>
SWV	<i>Voltametria de onda quadrada</i>
V	<i>Volt</i>
VVLP	<i>Voltametria de varredura linear de potenciais</i>

1 Introdução Teórica

1.1 Medicamentos de uso humano

Um medicamento pode ser caracterizado como uma substância ou composição de substâncias manipuladas com a finalidade de prevenir, diagnosticar e tratar uma doença. É importante salientar que todos os medicamentos para o uso humano devem possuir elevados padrões de qualidade, segurança e eficácia. Assim sendo, o medicamento percorre um ciclo de procedimentos até chegar à fase de comercialização, tal como demonstrado na figura 1.1 [1].

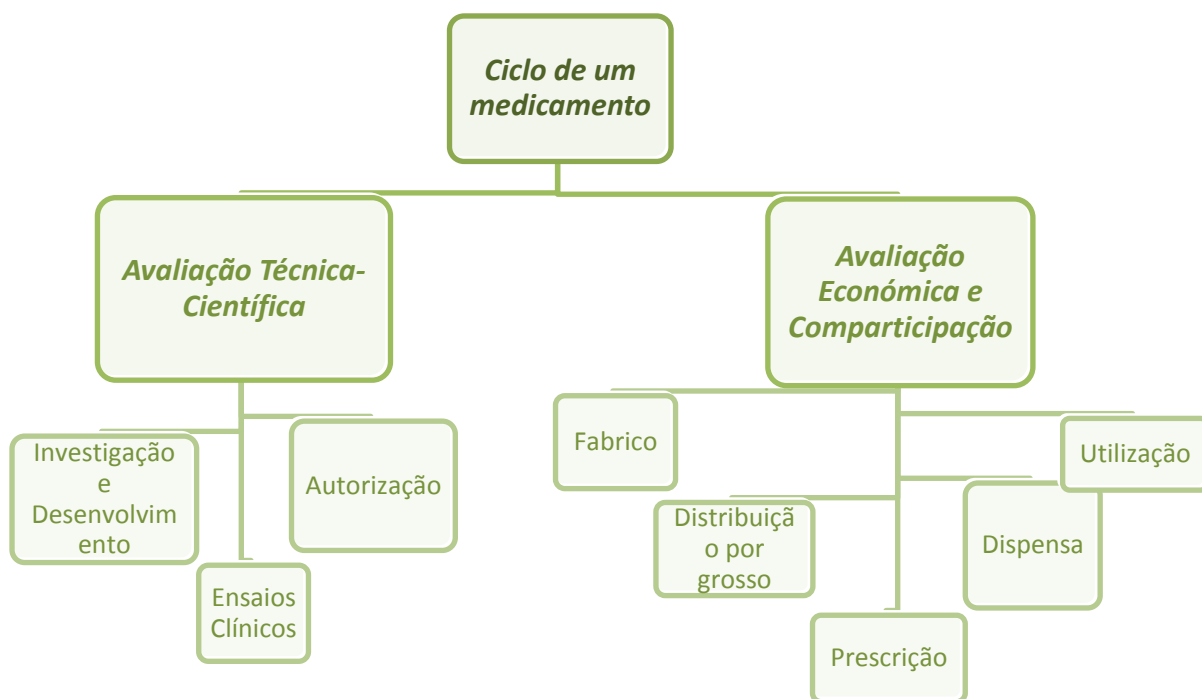


Figura 1.1 – Percurso de um medicamento até à sua utilização.

Inicialmente é efectuada uma avaliação técnico-científica, tem início na investigação e desenvolvimento, seguindo-se a realização de ensaios clínicos e finalmente a obtenção da autorização para a sua introdução no mercado. Os avanços científicos em tecnologias especializadas e o progresso no conhecimento dos sistemas biológicos são factores essenciais para o desenvolvimento de novos fármacos e levam a uma maior probabilidade de administrar o tratamento terapêutico mais adequado para determinadas doenças. Após a investigação é importante testar as soluções terapêuticas e laboratoriais, assim sendo são efetuados ensaios clínicos para verificar a eficácia e a segurança do medicamento em estudo. Estes testes são necessários para determinar a relação benefício/risco do fármaco e essencial para juntamente com outros factores adquirir a autorização necessária para a sua introdução no mercado (AIM).

Para se obter a autorização do respetivo fármaco, posterior comercialização, prescrição e dispensa, os fármacos passam por uma avaliação rigorosa cumprindo os elevados padrões de qualidade, segurança e eficácia.

Posteriormente é efectuada a avaliação económica e a comparticipação tendo em conta o valor terapêutico do medicamento e a vantagem económica. Esta avaliação inclui etapas como o fabrico, a distribuição, a prescrição, a dispensa e finalmente a utilização. Relativamente à distribuição, as actividades de abastecimento, armazenamento ou fornecimento de fármacos destinados à transformação, revenda ou utilização em serviços médicos, unidades de saúde e farmácias dependem sempre da autorização do fornecedor.

A garantia da qualidade e segurança deve ser igualmente verificada durante esta fase para que não haja qualquer meio de contaminação.

Normalmente os medicamentos são prescritos pelo médico, sendo posteriormente classificados quanto à sua dispensa, onde podem ser distinguidos entre medicamentos sujeitos a receita médica, medicamentos sujeitos a receita médica especial (estupefacientes e psicotrópicos), medicamentos de receita médica restrita (uso hospitalar e em certos casos ambulatoriais) e medicamentos não sujeitos a receita médica.

A fase final do ciclo de vida de um medicamento é considerada quando este chega ao paciente. O paciente deve sempre após a aquisição do medicamento ler o folheto indicativo para que seja utilizado corretamente [1].

1.1.1 Farmacocinética

A farmacocinética corresponde ao estudo do percurso do medicamento ao longo do organismo. Este processo é constituído pelos mecanismos de absorção, distribuição, metabolização e excreção, sendo determinada a concentração e o tempo despendido das moléculas do fármaco no seu local de ação (Figura 1.2) [2]

Inicialmente ocorre a absorção, processo este que consiste na transferência de um fármaco do seu local de administração para o compartimento central. No caso de fármacos sólidos a absorção depende inicialmente da dissolução do comprimido ou cápsula que posteriormente irá libertar o fármaco. É importante referir que um fármaco administrado por via oral necessita de ser absorvido primeiro pelo trato GI. No entanto a absorção final pode ser limitada pelas características do fármaco em questão, ou seja pelas suas propriedades físico-químicas, pelo metabolismo intestinal e pela transferência do fármaco que regressa ao lúmen intestinal por ação dos transportadores. Uma vez que o epitélio do estômago é recoberto por uma espessa camada de muco, a área disponível para o processo de absorção é bastante pequena, sendo verificada uma maior taxa de absorção do fármaco no intestino do que no estômago.

Posteriormente o fármaco absorvido percorre o fígado podendo ocorrer metabolismo e excreção biliar mesmo antes de chegar à circulação sistémica. Caso a capacidade metabólica ou excretora do fígado e do intestino seja grande para o fármaco a percentagem de fármaco reduz significativamente. Fatores como a estrutura anatómica, fatores fisiológicos e patológicos influenciam a concentração do fármaco no local de ação, e por esse motivo deve-se ter em conta a escolha da via de administração.

No entanto, nos indivíduos saudáveis, a taxa de esvaziamento gástrico é influenciada por fatores como o teor calórico dos alimentos, volume, osmolalidade, temperatura e pH do líquido ingerido, estado do metabolismo e temperatura ambiente tendo elevadas consequências na absorção do fármaco ingerido.

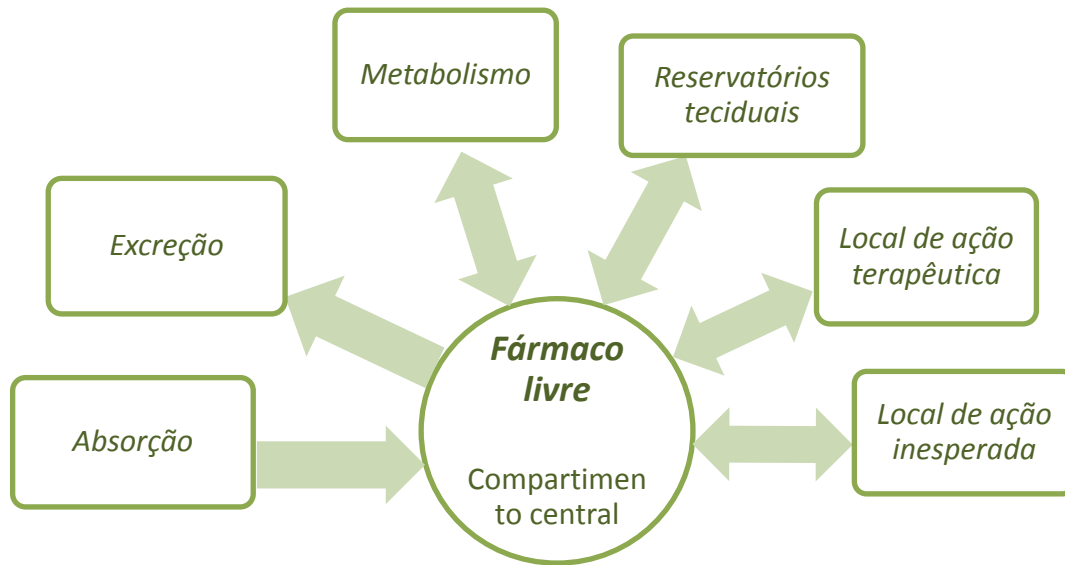


Figura 1.2 – Percurso de um medicamento até à sua utilização.

Após a absorção ou administração sistémica na corrente sanguínea, o fármaco distribui-se para os líquidos intersticiais e intracelulares. Este processo depende de alguns fatores fisiológicos e de propriedades físico-químicas específicos para cada fármaco. A taxa de libertação e a quantidade potencial do fármaco distribuído aos tecidos é determinada pelo débito cardíaco, fluxo sanguíneo local, volume tecidual e permeabilidade capilar. Sendo que o fígado, os rins, o cérebro e outros órgãos bem irrigados recebem a maior parte do fármaco. A segunda fase de distribuição envolve uma maior massa corporal, como os músculos e a pele, sendo responsáveis pela maior parte do fármaco distribuído ao espaço extravascular.

É importante referir também que o processo metabólico de um fármaco compreende um conjunto de reações enzimáticas que tem como função biotransformar fármacos e outros compostos estranhos em metabolitos, para posteriormente serem excretados pela urina. Assim sendo o metabolismo contribui para a eliminação dos fármacos evitando que estes permaneçam por um tempo indefinido no organismo.

As reacções metabólicas podem ser divididas em dois tipos, o primeiro tipo tem em conta a oxidação, redução e hidrólise e o segundo tipo a conjugação. Relativamente aos metabolitos, estes podem ser ativos podendo assim agir por mecanismos de ação similares, diferentes ou até mesmo de ação antagonista. Estes são importantes para prever o resultado terapêutico e para explicar a toxicidade de um determinado fármaco [2, 3].

Finalmente a última etapa consiste na excreção dos fármacos, onde estes são eliminados sem qualquer alteração ou são convertidos em metabolitos. O órgão mais importante para a execução desta etapa é o rim que tem como função a excreção dos fármacos e metabolitos na urina seguindo três etapas distintas: a filtração glomerular, a secreção tubular ativa e a reabsorção tubular passiva. No que diz respeito às substâncias excretadas nas fezes, normalmente são fármacos ingeridos via oral que não foram absorvidos ou metabolitos secretados diretamente no trato intestinal que não foram reabsorvidos [3, 4].

Quando se desenvolvem métodos de detecção de fármacos, seja para controlo clínico seja para controlo de contaminação ambiental é importante conhecer a sua farmacocinética, nomeadamente como será excretado e sob que forma (metabolizado ou não metabolizado).

1.1.2 Antibióticos

Os antibióticos são definidos como substâncias químicas produzidas a partir de várias espécies de microrganismos, vegetais e animais, possui como objetivo impedir o crescimento de outros microrganismos como fungos ou bactérias [5, 6].

As bactérias caracterizadas por organismos unicelulares, foram descobertas por Van Leeuwenhok por volta do ano 1670. Posteriormente no século XIX considerou-se a possibilidade destes microrganismos serem os causadores de processos infecciosos, sendo esta hipótese aceite após Louis Pasteur demonstrar que algumas linhagens de bactérias eram importantes para os processos de fermentação e que eram amplamente distribuídas pelo meio ambiente [7].

Após a segunda metade do século XIX, Robert Koch identificou alguns microrganismos responsáveis pela doença da tuberculose, cólera e a febre tifóide, nesta época foram realizadas pesquisas à procura de agentes químicos que apresentassem atividade antibiótica [7].

Nessa altura o pai da quimioterapia Paul Ehrlich usou as substâncias químicas para tratar infeções. Este foi responsável pelos conceitos primários na interferência da substância química com a proliferação de microrganismos, em considerações toleráveis pelo hospedeiro.

Por volta de 1909, este mesmo cientista desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética usado para o tratamento da sífilis [7, 8].

No ano 1940 a 1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivos.

No ano 1960 a 1980 introduziram-se no mercado antibióticos semi-sintéticos, eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivos e Gram negativos, sendo que a maioria destes antibióticos são obtidos a partir de protótipos naturais microbianos [7, 8].

Um subproduto formado durante a síntese da cloroquina em 1962 foi sintetizado pela primeira vez, o ácido nalidíxico. Este demonstrou possuir atividade antibacteriana contra um vasto número de microrganismos responsáveis por variadíssimas infeções no homem e nos animais. O ácido nalidíxico tem como mecanismo de ação a inibição da síntese da enzima ADN girase. Esta apresenta uma atividade antibacteriana máxima em infeções causadas pela *escherischiacoli*, *aerobacter*, *proteus mirabilis*, entre outros [7, 8].

Esta descoberta permitiu a síntese de novos derivados que posteriormente vieram a ser aplicados no combate a infeções causadas por agentes antibacterianos.

Por volta dos anos 70 foram sintetizadas novas 4-quinolonas de primeira geração e dez anos depois aparecem no mercado as quinolonas de segunda geração, estas contêm um átomo de flúor na posição C-6, como é o caso da Norfloxacin, desenvolvida em 1977 pela empresa farmacêutica japonesa Kyorin, sendo indicada inicialmente para combater bactérias Gram-negativos e utilizada para o tratamento de infeções no trato urinário.

As infeções bacterianas têm sido dominadas por produtos naturais e as suas variantes semi-sintéticas, embora tenha sido alargado o uso de anti-bacterianos de origem puramente sintética.

O principal problema do uso de antibióticos em larga escala é o desenvolvimento da resistência bacteriana. Muitas vezes isto acontece por um uso excessivo e inadequado deste tipo de fármacos. O mecanismo celular desta resistência deve-se a uma modificação genética estável que é transmissível em gerações. Apesar da mutação ser frequente, existem outros mecanismos de transferência do material genético que causam a resistência ao antibiótico, tais como a transdução, transformação, conjugação, elementos extracromossomais e DNA recombinante [5] [9].

1.1.3 Norfloxacin

A Norfloxacin (NFX), é um antibiótico sintético pertencente ao grupo das fluorquinolonas de 2ª geração, com a fórmula química ácido 1-etil-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolonecarboxílico.

As quinolonas e fluoroquinolonas pertencem a um grupo de fármacos antibacterianos de largo espectro de atuação. Ativos contra bactérias Gram negativos e positivos, porém certos microrganismos podem adquirir uma rápida resistência a estes antibióticos. É considerado o grupo de antibióticos mais tóxico, verificando-se assim um grande número de pacientes a sentir danos colaterais. Muitos dos fármacos pertencentes a este grupo foram já retirados do mercado, devido aos severos danos colaterais provocados [7, 10-12].

As fluoroquinolonas agem inibindo a topoisomerase IV de bactérias Gram positivos e apresentam selectividade 1000 vezes superior para enzimas bacterianas em relação às enzimas correspondentes às células humanas. Nas bactérias Gram negativos, o alvo das fluoroquinolonas é a topoisomerase II, também conhecida como DNA-girase, que apresenta as mesmas funções da topoisomerase IV [7, 10-12].

As DNA-topoisomerases mudam o número de ligações no DNA superenrolado através de quebras transitórias no DNA, apresentando-se topologicamente relaxado devido à quebra temporária numa fita (tipo I) ou em ambas as fitas ao mesmo tempo (tipo II). Assim as topoisomerases são essenciais para a viabilidade celular nas células procarióticas e eucarióticas. As quinolonas apresentam uma boa selectividade para as células bacterianas [7, 10-12].

A NFX é amplamente utilizada para o tratamento de infeções oculares, infeções na pele, bem como para pacientes com infeções intra-abdominais em combinação com agentes antianaeróbicos [13-15]. O átomo de flúor na posição 6, como se pode verificar na figura 1.3, proporciona um incremento potencial contra organismos Gram-negativos e o radical piperazina na posição 7 é responsável pela atividade antipseudomonal da NFX.

Portanto, o uso generalizado da NFX e a necessidade do estudo clínico e farmacológico requerem métodos analíticos de análise rápida e selectiva para a sua determinação. Assim, vários métodos têm sido propostos para a determinação da NFX em preparações farmacêuticas ou em amostras biológicas, nomeadamente, espectrofotométricos [16], fluorimétricos [17], eletroquímicos [18] e por HPLC [19-21]. Os métodos baseados em HPLC são bastante utilizados devido à elevada sensibilidade e capacidade para minimizar interferentes. No entanto são métodos lentos, requerem o uso de grandes quantidades de

solventes e possuem um custo elevado, devido ao preço dos equipamentos e da manutenção. Os métodos espectrofotométricos apresentam várias desvantagens, como a necessidade de passos de extração e o uso de reagentes específicos. Os métodos eletroquímicos apresentam várias vantagens, tais como boa sensibilidade, baixo custo, fácil manuseamento e são amigos do ambiente (volumes pequenos de solventes), além disso são facilmente miniaturizados. Dos métodos eletroquímicos existentes para a detecção de NFX, nenhum apresenta elevada seletividade. Daí a necessidade de se incorporar elementos seletivos para a detecção eletroquímica de NFX.

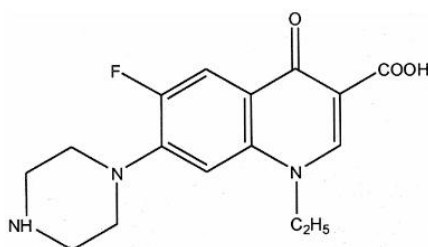


Figura 1.3 – Molécula de Norfloxacin

1.2 Sensores

Um sensor é considerado um dispositivo que fornece informação química ou física de um sistema, convertendo a informação adquirida num sinal elétrico. Possui três componentes, a parte recetora sensível às características do sistema, o transdutor que converte a informação obtida num sinal elétrico e o amplificador do sinal [22, 23].

Tendo em conta a caracterização dos sensores em geral, estes podem ser classificados em dois tipos, químicos ou físicos. Os sensores físicos são utilizados para a medição de propriedades de natureza puramente física, como a temperatura, o índice de refração entre outros. Já os sensores químicos são utilizados para o reconhecimento de constituintes químicos, como a determinação da concentração de uma substância. Um sensor químico é constituído normalmente por 3 partes: elemento sensor, transdutor e sistema eletrónico. O elemento sensor tem como função o reconhecimento das moléculas a analisar, sendo por isso o aspeto fundamental para a obtenção da seletividade. Após o reconhecimento é necessário transformá-lo num sinal elétrico mensurável, sendo este processo efetuado pelo elemento de transdução. Finalmente o sinal elétrico é recebido e tratado no sistema eletrónico.

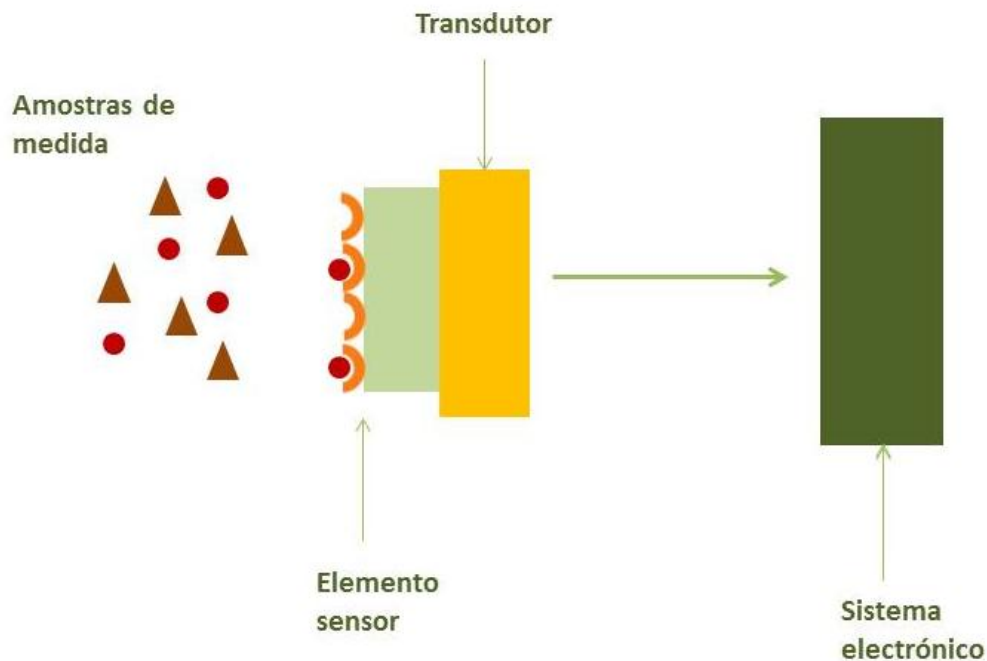


Figura 1.4 – Esquema da construção de um sensor.

Os sensores químicos podem ser classificados de várias formas, como por exemplo pelo tamanho, tipo de aplicação ou mecanismo de transdução da resposta. Existem várias possibilidades para elaborar o elemento sensor. Um caso frequente é a utilização de um sistema biológico (enzima, anticorpo) com forma a garantir a seletividade, denominando-se neste caso por biossensor. Outro processo bastante utilizado consiste na utilização de polímeros molecularmente impressos, utilizados como elementos de reconhecimento (ver figura 1.4).

Uma forma muito comum de classificar os sensores químicos é a partir do sistema de transdução, estes podem ser divididos da seguinte forma:

- Eletroquímico (voltamétrico, potenciométrico, capacitivo, amperimétrico)
- Elétrico (semicondutores, semicondutores orgânicos, condutividade, dielétricos)
- Ótico (transmissão/absorção, reflexão, espalhamento, índice de refração)
- Sensíveis à variação de massa (piezoelétrico, superfície de onda acústica)
- Magnético (medidas paramagnetismo)
- Efeito térmico (medidas de mudança de temperatura).

Visto que neste trabalho foi desenvolvido um sensor eletroquímico algumas características deste tipo de sensor serão analisadas.

1.2.1 Sensores eletroquímicos

Um sensor eletroquímico permite a recolha de dados e a obtenção da informação com a mínima manipulação do sistema.

Os resultados obtidos podem ser analisados e correlacionados com outros parâmetros no ambiente em que estão inseridos. Estes sensores possuem características muito próprias o que os distingue de outros métodos instrumentais, sendo cada vez mais precisos, sensíveis e seletivos, permitindo assim a obtenção da informação *in situ* e em tempo real [24, 25]. Além disso, este tipo de sensor apresenta normalmente um baixo custo, facilidade de automação, portabilidade e a possibilidade de miniaturização.

O desenvolvimento de um sensor eletroquímico deve ter em conta determinadas características, tal como se pode verificar no esquema da figura 1.5 [24, 25].

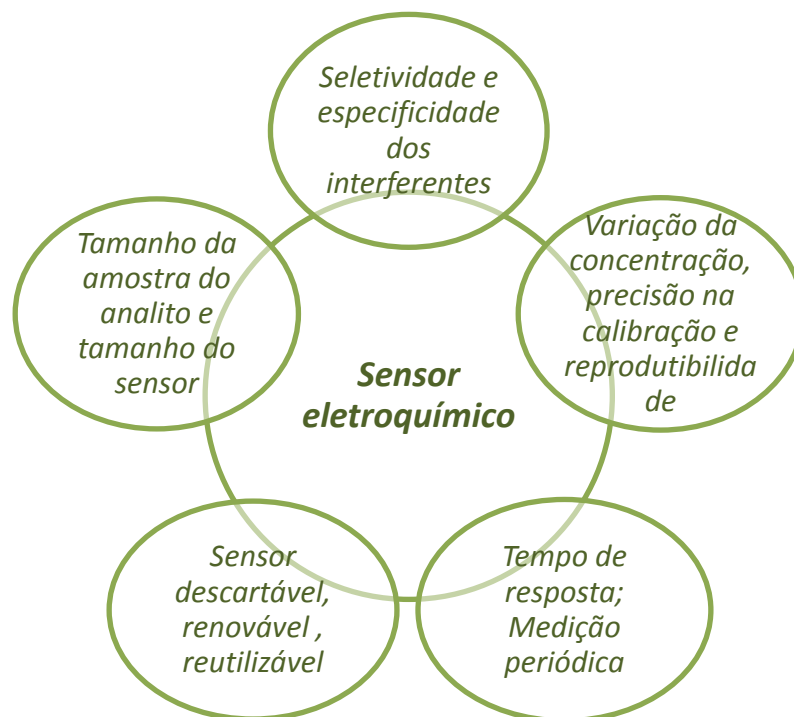


Figura 1.5 – Características de um sensor eletroquímico.

Neste tipo de sensor, três tipos de técnicas eletroanalíticas são usadas :

- **Condutimetria**, onde a concentração de carga é obtida através da medição da resistência da solução.
- **Potenciometria**, onde a diferença de potencial numa célula eletroquímica é medida na ausência de corrente.
- **Voltametria**, onde a corrente é registada como a função do potencial aplicado. Geralmente podem atingir limites de deteção mais baixos. Várias espécies que reagem aos diferentes potenciais aplicados podem ser determinadas quase em simultâneo no mesmo ensaio [24, 25].

1.3 Polímeros Molecularmente impressos (MIPs)

Os polímeros molecularmente impressos (MIPs) são constituídos por materiais sintéticos com zonas de reconhecimento geradas artificialmente. São capazes de efetuar uma ligação específica com uma molécula-alvo [26-28]. Estes materiais sintéticos são obtidos pela polimerização de monómeros funcionais em torno de uma molécula molde, conduzindo a uma alta rede de polímero cruzado tridimensionalmente.

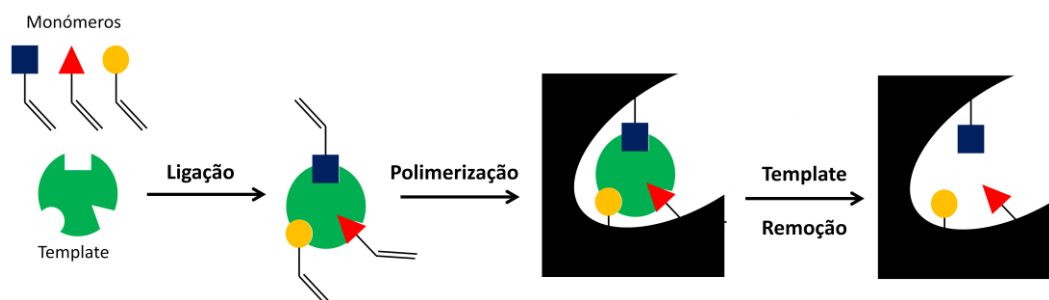


Figura 1.6 – Edificação de um MIP.

Os monómeros são escolhidos tendo em conta a sua capacidade de interagir com os grupos funcionais da molécula molde. Após efetuar a polimerização, a molécula molde é extraída como se pode verificar na figura 1.6, formando-se zonas de ligação (cavidades) que são complementares à forma, ao tamanho e aos grupos funcionais do analito. Os polímeros impressos resultantes são estáveis, robustos e resistentes a uma ampla gama de pH, temperatura e solventes. Por conseguinte, o MIP é a forma de simular sinteticamente processos de

seletividade estabelecidos por recetores naturais, como enzimas ou anticorpo-antigénio, embora sem as limitações de estabilidade associados. Assim sendo deve-se salientar que a síntese do MIP é relativamente barata e de fácil utilização, tornando-se uma alternativa evidente para o uso de recetores naturais [26-28].

Existem três abordagens diferentes para a preparação de um MIP, sendo elas as abordagens covalentes, não covalentes e semi-covalente.

A abordagem covalente, envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre a molécula e os monómeros durante a polimerização. De seguida o molde é removido do polímero por clivagem das ligações covalentes correspondentes. A elevada estabilidade da interação entre o molde-monómero conduz a uma população bastante homogénea nas zonas de ligação, minimizando a existência de zonas não específicas. No entanto, há um número mais limitado de ligações covalentes que podem ser estabelecidas. Além disso, devido à estabilidade das ligações o processo de remoção é muitas vezes difícil, sendo a cinética das interações lenta.

Uma solução intermédia é a abordagem semi-covalente. Neste caso, o molde é também ligado covalentemente a um monómero funcional, embora a re-ligação do molde se baseie somente em interações não-covalentes [26-28].

Por fim a abordagem não covalente, introduzida por Arshady e Mosbach, baseia-se na formação de interações não covalentes relativamente fracas (ou seja, ligação de hidrogénio, interações iónicas) entre a molécula molde e os monómeros. Estas ligações permitem a formação de complexos misturados na pré-polimerização. Há por isso a necessidade de se deixar estabilizar a solução. Esta abordagem é a mais utilizada para a preparação de um MIP. No entanto, possui algumas desvantagens devido ao facto de as interações entre o molde-monómeros terem de ser reguladas por um processo de equilíbrio [26-28].

Com a finalidade de deslocar o equilíbrio no sentido da formação do complexo molde-monómero o uso de uma elevada quantidade de monómero é essencial. O excesso de monómeros livres são incorporados aleatoriamente na matriz polimérica, levando à formação de zonas de ligação não seletivas. Isto é, existe uma maior heterogeneidade nas ligações do polímero formado, perdendo-se alguma seletividade.

Na solução de pre-polimerização, a boa interação entre o molde e os monómeros é a condição essencial para a obtenção das redes de MIPs com zonas de reconhecimento de potenciais. Existem duas estratégias principais empregues para a tecnologia MIP dependendo da natureza da interação da pre-polimerização entre o molde e o monómero. A primeira

estratégia consiste na abordagem de auto-montagem similar aos sistemas de reconhecimento biológico, onde são usadas forças não-covalentes, tal como as ligações de hidrogénio, forças de Van der Waals, iões ou interações hidrofóbicas. No que diz respeito à abordagem de pré-organização são usadas ligações covalentes reversíveis [29].

1.4 Técnicas voltamétricas

A voltametria consiste numa técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registo da curva corrente-potencial, efetuadas durante a eletrólise de uma espécie, numa célula eletroquímica constituída pelo menos por dois elétrodos [30-32].

Seguem-se as várias técnicas voltamétricas:

- **Voltametria Cíclica**

A voltametria cíclica ou voltametria de varredura linear de potenciais (VVLV) é considerada uma técnica eletroanalítica que se tem tornado importante e amplamente utilizada nas diversas áreas da química, figura 1.7. É raramente utilizada para determinações quantitativas, mas é amplamente usada para realizar estudos de processos redox, para compreender reações intermediárias e para obter a estabilidade dos produtos da reação. Estas características juntamente com a facilidade de se efetuar medições, fazem da voltametria cíclica uma técnica muito útil para as diferentes áreas como a eletroquímica, química inorgânica, bioquímica entre outras.

Esta técnica baseia-se na variação do potencial aplicado a um elétrodo de trabalho, tanto para a direção direta como para a direção inversa, enquanto se monitoriza a corrente. Quando é realizado um scan inicial, este pode ser feito no sentido negativo para o potencial de comutação. Neste ponto o scan será revertido e executado no sentido positivo, dependendo da análise e do tipo de ciclo, caso seja um ciclo completo, um ciclo parcial ou uma serie de ciclos [30-32].

Os parâmetros mais importantes num voltamograma cíclico são o potencial de pico (E_{pc} , E_{pa}) e a intensidade de corrente (i_{pc} , i_{pa}) correspondentes ao pico catódico e anódico, respectivamente.

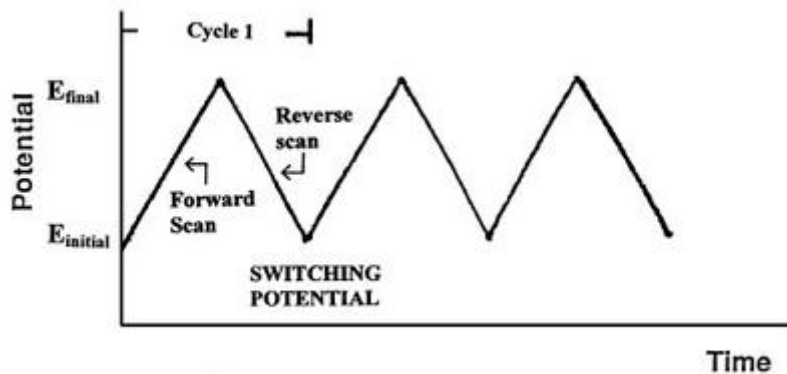


Figura 1.7 –Esquema de uma voltametria cíclica.

Caso o processo de transferência de elétrons seja rápida ao comparar com outros processos como a difusão, a reação é considerada como eletroquimicamente reversível e a separação do pico é definida pela seguinte equação:

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 2.303 RT / nF \quad (1)$$

- **Métodos de pulso**

Com a finalidade de aumentar a velocidade e sensibilidade, foram testadas ao longo do tempo diversas formas de modulação do potencial. De seguida são descritas três destas técnicas de pulso utilizadas [30, 33-36].

A voltametria de pulso normal utiliza uma série de impulsos de potencial de aumento da amplitude. A medição da corrente é perto do final de cada impulso, o que permite adquirir tempo para que a carga da corrente decaia. Geralmente é executada numa solução sem agitação em qualquer DME (polarografia de pulso normal) ou eletrodos sólidos.

O potencial é pulsado a partir do potencial inicial E_i . A duração do pulso é usualmente de 1 a 100ms e o intervalo entre os impulsos de 0,1 a 5 seg. O voltamograma da figura 1.8 apresenta o potencial para o qual o impulso intensifica no eixo vertical pelo tempo referente ao eixo horizontal [30, 33-36].

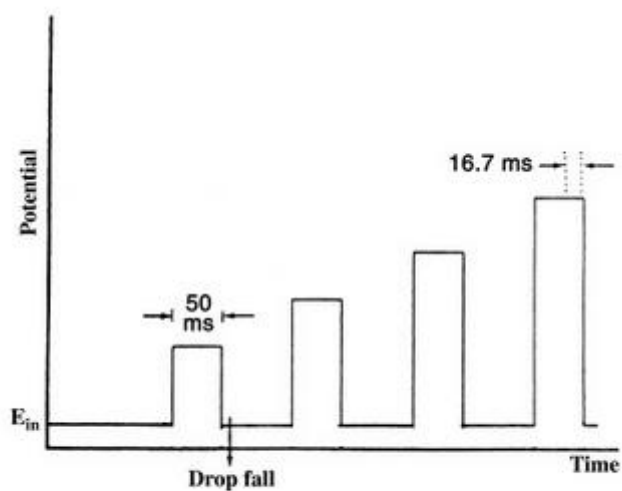


Figura 1.8 – Esquema da voltametria de pulso normal.

A voltametria de Pulso Diferencial é uma técnica parecida com a voltametria de pulso normal. No entanto difere no DPV uma vez que cada impulso de potencial é fixado e a amplitude varia entre 10 e 100mV, sendo sobreposta a uma lenta mudança da base do potencial. A corrente é medida em dois pontos por cada impulso, o primeiro ponto é medido imediatamente antes da aplicação do impulso, o segundo ponto corresponde ao fim do impulso. Estes postos de amostragem são seleccionados para permitir o decaimento da corrente não faradaica.

A instrumentação para a voltametria de pulso diferencial foi desenvolvida de modo a que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial sejam realizados em intervalos de tempo bastante pequenos [30, 33-36].

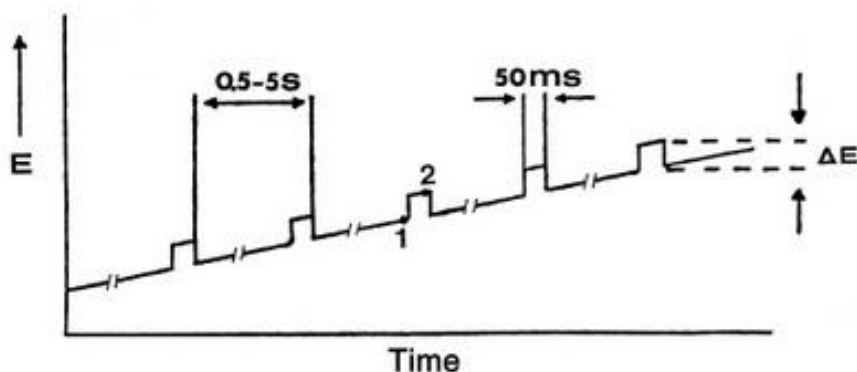


Figura 1.9 – Esquema da voltametria de pulso diferencial.

A voltametria de onda quadrada é considerada uma das técnicas mais utilizadas para fins analíticos uma vez que apresenta bastantes vantagens em relação à detetabilidade e à resolução frente às técnicas da corrente contínua. Surgiu em 1957 devido aos estudos realizados por Baker, sendo esta limitada pela tecnologia eletrônica. No entanto, com os progressos da tecnologia analógica e digital, esta passou a ser incorporada no polarógrafo a partir dos anos 80, principalmente devido à sua forma de varrimento rápido, também chamada de voltametria de onda quadrada de Osteryoung (pesquisador americano que a desenvolveu). Esta técnica pode ser utilizada para realizar experiências de um modo mais rápido quando comparada com a técnica de pulso diferencial, contendo sensibilidade semelhante ou até melhor, uma vez que ocorrem compensações da corrente capacitiva.

É de referir que uma experiência usando a técnica de voltametria de pulso diferencial, figura 1.9, normalmente necessita de cerca de três minutos, enquanto que a mesma experiência pode ser efetuada em segundos através da voltametria de onda quadrada.

Tendo em conta a programação do potencial usado na voltametria de onda quadrada, existem dois tipos de ondas quadradas diferentes.

- A onda quadrada simétrica, que consiste na colocação desta sobre uma rampa de potencial em forma de degraus de maneira a que o pulso direto da onda quadrada coincida com o início do degrau da rampa.
- O pulso reverso da onda quadrada, que coincide com a metade da etapa da rampa. Tendo em conta os parâmetros tempo e potenciais aplicados, sendo que τ corresponde ao tempo de um ciclo de onda quadrada e também de um ciclo da rampa em degraus. A frequência da onda quadrada em Hz corresponde a $1/\tau$. E_{sw} designa a amplitude do pulso da onda quadrada dada em mV. $2xE_{sw}$ corresponde à amplitude pico a pico, isto

é a amplitude do pico direto ao reverso. Finalmente o E_{etapa} refere-se ao potencial da etapa da rampa do potencial em degraus [30, 33-36].

O sinal de excitação na SWV como se verifica na figura 1.10 consiste num impulso de onda quadrada simétrica, onde a corrente medida, é obtida pela diferença entre a corrente direta e inversa e centrada no potencial redox. A altura do pico é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas, sendo possível a deteção direta de limites tão baixos quanto 1×10^{-8} M.

Esta técnica possui inúmeras vantagens, entre elas a sua excelente sensibilidade e a diminuição das correntes de fundo. A velocidade juntamente com o controle do computador e a média do sinal, permite a realização de experiências repetidamente e o aumento da relação sinal-ruído. As aplicações da voltametria de onda quadrada incluem o estudo da cinética do eléctrodo em relação à anterior, em relação à sequência, ou às reações químicas catalíticas homogéneas, inclui ainda a determinação de algumas espécies ao nível de vestigiais e o uso para a deteção eletroquímica em HPLC.

Por sua vez existe uma outra técnica que do ponto de vista analítico tem vindo a ser incorporada em diversos instrumentos comerciais sendo ela a voltametria de onda quadrada de varrimento rápido [30, 33-36].

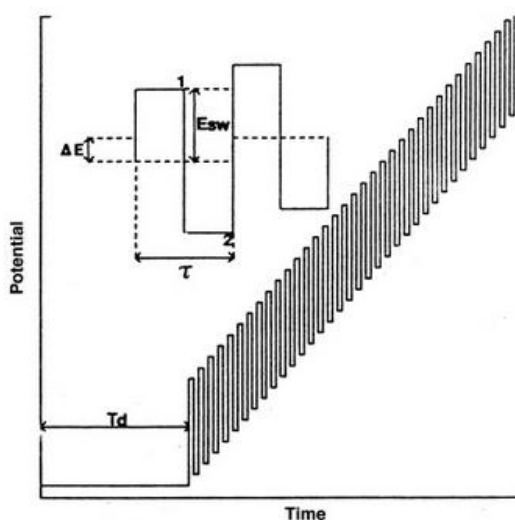


Figura 1.10 – Esquema da voltametria de onda quadrada.

1.4.1 Célula eletroquímica

As células eletroquímicas utilizadas na voltametria são do tipo eletrolíticas e podem ter dois ou três elétrodos.

Devido às limitações que a célula de dois elétrodos apresenta, normalmente é utilizada a célula de três elétrodos sendo esta constituída pelo elétrodo de trabalho, o elétrodo de referência e o elétrodo auxiliar que pode ser de platina, ouro, carbono vítreo, entre outros [30, 32-34].

Assim os elétrodos são conetados a um amplificador operacional que atuará quando for aplicada uma diferença de potencial entre o elétrodo de trabalho e o elétrodo de referência, levando a um aumento da resistência do elétrodo de referência e a uma diminuição da resistência do elétrodo auxiliar. Permite assim a passagem da corrente entre o elétrodo de trabalho e o auxiliar, evitando a ocorrência de distúrbios (eletrólise) no elétrodo de referência.

Assim sendo o elétrodo de referência poderá manter o seu potencial constante durante o período de medições.

As vantagens que diferenciam uma célula de três elétrodos quando comparada com outros tipos de células são as seguintes:

- É considerada a mais adequada para soluções diluídas;
- Pode ser usada para soluções de alta resistência, como solventes orgânicos ou mistura de água mais solventes orgânicos);
- Pode ser usada com eletrólitos de suporte mais diluídos [30, 32-34].

1.4.2 Elétrodo de carbono vítreo

O elétrodo de carbono vítreo possui excelentes propriedades mecânicas e elétricas, uma ampla janela de potencial, excelente resistência a solventes e uma boa performance relativamente à reprodutibilidade, daí a sua elevada utilização. No entanto é necessário efetuar um pré-tratamento da superfície, para que os elétrodos de carbono vítreo sejam reprodutíveis e para que se verifique um melhor desempenho do analítico. O pré-tratamento é geralmente efetuado através do polimento com partículas de alumina sucessivamente menores (0,3 e posteriormente com 0,05 μm) sobre um tecido de polimento. Posteriormente o elétrodo deve ser lavado com água ultrapura antes da sua utilização. São também necessários para melhorar o

desempenho do eletrodo passos de ativação adicionais, tais como procedimentos eletroquímicos, químicos, térmicos ou tratamentos a laser [30].

A melhoria da reatividade do eletrodo de trabalho tem sido atribuída à remoção de contaminantes presentes na superfície, expostas nas arestas do carbono e devido à verificação do aumento na densidade de grupos de oxigênio superficiais, que atuam como mediadores da superfície interfacial [30, 37].

Um material de carbono vítreo similar, embora altamente poroso é o carbono vítreo reticulado (RVC), este é amplamente aplicado para a análise do fluxo e da espectroeletroquímica. O RVC possui uma estrutura com poros abertos (tendo um aspeto de uma esponja), pertence à classe dos carbonos turbostráticos e apresenta uma estrutura carbonosa lamelar, semelhante à grafite. A rede combina as propriedades eletroquímicas do carbono vítreo com variadíssimas vantagens, tais como propriedades semicondutoras, expansão térmica inexpressiva, condutividade térmica menor, reduzida densidade, alta resistência à corrosão, coeficiente de expansão térmica igual ao da grafite artificial e a resistência ao choque térmico corresponde a um décimo da resistência da grafite. O carbono vítreo reticulado apresenta também uma menor resistividade elétrica específica entre os materiais carbonosos, que ronda os $40 \times 10^{-6} \Omega \text{m}$. Tendo em conta as matrizes porosas, cerca de 96 a 98% do seu volume consiste em poros abertos. Assim sendo este material é utilizado nas diversas aplicações, especialmente na saúde pública, na construção de próteses ósseas e biossensores, permitindo determinar enzimas e outros compostos presentes no metabolismo e ainda a avaliação da toxicidade das águas e soluções orgânicas [37].

1.4.3 Eletrodo de carbono vítreo modificados

Apesar de muitos serem utilizados como eletrodos de trabalho, nos últimos anos este tipo de eletrodo tem sido essencialmente usado como base para introduzir modificações que permitam aumentar a sensibilidade e/ou a seletividade da resposta analítica. Por isso têm sido muito utilizados para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Dois tipos de modificações frequentemente reportadas são a modificação com polímeros condutores e a modificação com nanomateriais, como os nanotubos de carbono.

1.4.3.1 Modificação com polímeros - pirrol

Devido às propriedades eletroquímicas únicas, os polímeros condutores têm atraído grande interesse no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Podem ser obtidos por processos químicos ou eletroquímicos. A síntese química envolve monómeros que são sujeitos a oxidação e é usada na preparação de soluções. A síntese eletroquímica permite a preparação de filmes poliméricos em substratos condutores (por exemplo na superfície de um eletrodo de carbono vítreo), permitindo um grande controlo no processo de polimerização e na morfologia dos polímeros obtidos. Uma das principais utilizações deste tipo de polímeros é na preparação do MIP nas superfícies dos eletrodos [38, 39]. De entre os inúmeros monómeros utilizados, (anilina, pirrol, acetileno, ácido aminobenzóicos, tiofeno, etc) o pirrol é um dos mais descritos na preparação de sensores MIP [40]

O pirrol é considerado um composto orgânico constituído por cinco átomos de hidrogénio (H) e um átomo de Azoto (N) ligados a 4 átomos de carbono (C) dando origem a um pentágono regular, sendo assim considerado uma molécula cíclica. Uma vez que apresenta uma estrutura anelar e devido ao fato de possuir no anel um elemento diferente do carbono, sendo substituído pelo oxigénio, enxofre ou azoto, o pirrol é considerado um composto heterocíclico [41, 42].

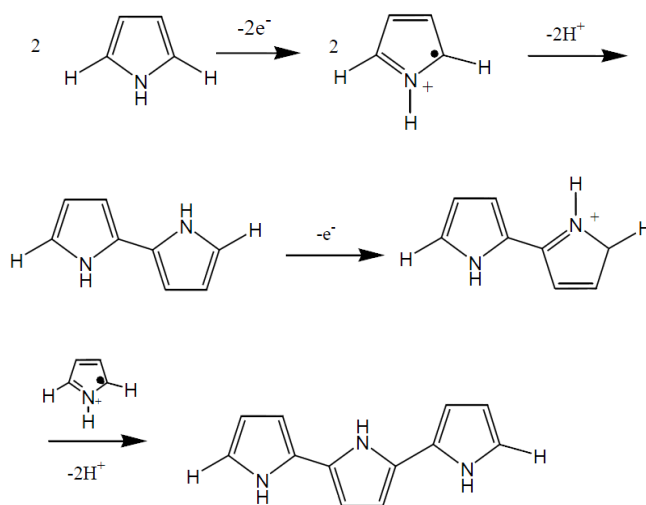


Figura 1.11 – Polimerização oxidativa do monómero pirrol.

O PPy é assim sobreoxidado em potenciais positivos, podendo nestas casos, resultar numa perda de condutividade e interferir na estabilidade, Figura 1.11. Embora não sejam propriedades muito desejadas a sobreoxidação tem sido bastante utilizada nas mais diversas aplicações eletroquímicas [43]

1.4.3.2 Modificação para amplificar o sinal analítico – nanotubos de carbono

Atualmente muita atenção tem sido centrada no desenvolvimento e na aplicação de nanomateriais, nomeadamente na capacidade que apresentam para amplificar o sinal nos sensores eletroquímicos. Os nanomateriais têm sido usados devido à sua larga área de superfície e conseqüente aumento dos pontos de ligação disponíveis para a deteção de um determinado analito. Vários tipos de nanomateriais têm sido usados nos sensores eletroquímicos, mas os nanotubos de carbono são dos mais apelativos. Isto porque apresentam propriedades eletrónicas, químicas e mecânicas únicas.

Os CN são formados a partir de arranjos hexagonais de carbono dando origem a pequenos cilindros. Normalmente possuem uma faixa de diâmetro de poucos angstroms a dezenas de nanómetros e podem ter um comprimento acima de vários centímetros. Existem dois tipos de nanotubos de carbono que podem apresentar uma elevada perfeição a nível estrutural, um deles são os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT), constituídos por uma única folha de grafite enrolada sobre si, de tal forma que coincidam dois pontos cristalograficamente equivalentes na rede hexagonal. As propriedades dos nanotubos de parede simples dependem do diâmetro e do ângulo helicoidal, sendo que estes dois parâmetros resultam dos índices de Hamada (n,m). O vector C também conhecido por *chiral*, que define a posição relativa aos dois pontos é definido tendo em conta os dois números inteiros (n,m) e mediante os vetores unitários da rede hexagonal a_1 e a_2 , obtendo assim a seguinte equação

$$C = na_1 + ma_2 \quad (2)$$

Tendo em consideração os valores relativos do par (n,m) pode-se obter três tipos de SWCNT .

Assim sendo se os valores relativos ($n = m$) o SWCNT é considerado do tipo *armchair*, caso ($n, m = 0$) é considerado do tipo *zig-zag* e caso ($n \neq m \neq 0$) é considerado do tipo *chiral*, figura 1.12.

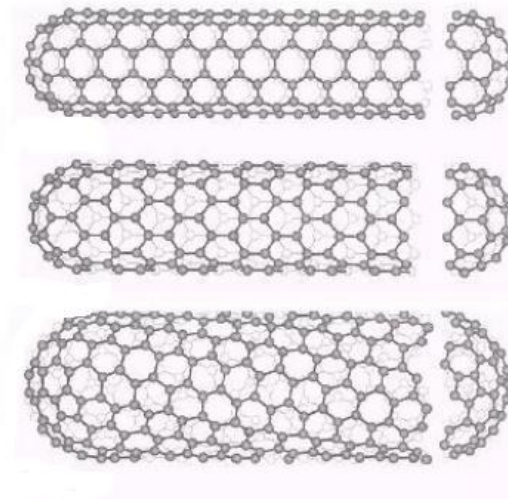


Figura 1.12 – Nanotubo de carbono de paredes simples do tipo *amchair*, *zig-zag* e *chiral*.

Este tipo de nanotubos possuem propriedades eletrônicas únicas tendo em conta os índices de Hamada (n,m), sendo que um nanotubo é considerado metálico quando $n-m$ é múltiplo de 3, caso contrário é definido como semicondutor.

No que diz respeito aos nanotubos do tipo *armchair*, estes são definidos como metálicos, enquanto que os *zig-zag* e *chiral* podem ser definidos como metálicos ou semicondutores.

Outro tipo de nanotubos de carbono são os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT), estes são constituídos por um conjunto de nanotubos concêntricos. Podem conter tanto tubos quirais como aquirais, bem como exibir vários ângulos quirais com diferentes diâmetros de cada tubo, podendo cada um dos tubos possuir natureza distinta, *armchair*, *zig-zag* ou *chiral*.

Os nanotubos de múltiplas camadas são menos sensíveis aos fatores de quiralidade e comprimento do tubo, visto que o seu diâmetro possui uma ordem de grandeza maior quando comparado com os de camada única.

Possuem propriedades eletrônicas semelhantes às propriedades dos SWCNT devido ao fraco acoplamento entre os cilindros de carbono concêntricos. Uma vez que apresentam estruturas quasi-unidimensionais, o transporte eletrônico nos nanotubos de carbono metálicos ocorre sem espalhamento, o que leva à condução de correntes sem aquecimento.

Tendo em conta as investigações teóricas, os SWCNT representam os sistemas mais adequados devido à maior facilidade na descrição computacional, como se pode observar na figura 1.13. Já os MWCNT possuem a vantagem de serem produzidos com maior facilidade e com um custo mais reduzido.

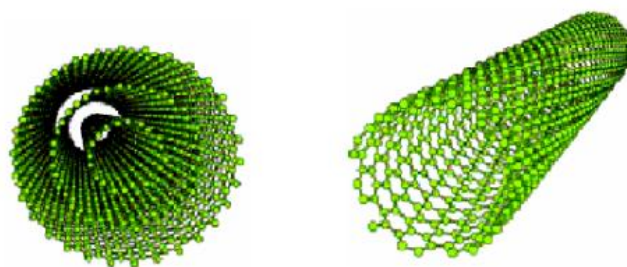


Figura 1.13 – Descrição computacional de um nanotubo de carbono de paredes múltiplas e de um nanotubo de carbono de paredes simples.

Devido à elevada área da superfície eletroquímica constituída pelas matrizes porosas dos nanotubos, combinada com a elevada condutividade eletrônica e com as propriedades mecânicas, este material é ótimo para ser utilizado em eléctrodos para dispositivos onde é efetuada a injeção de carga eletroquímica de dupla camada.

A possibilidade de aplicar nanotubos de carbono não metálicos nos sensores químicos tornaram-se bastante interessantes, uma vez que o transporte eletrônico dos nanotubos e a termoelétrica (tensões entre as junções causadas pela interjeicção de diferentes temperaturas) são muito sensíveis a substâncias que afetam a quantidade de carga injetada.

Possui como principais vantagens o instante de tempo do elemento sensível do CN e a pequena quantidade de material necessário para obter uma resposta.

As propriedades excepcionais dos nanotubos têm sido alvo de estudo no que diz respeito às propriedades mecânicas dos nanotubos.

Assim sendo a dispersão uniforme ao longo da matriz polimérica, a otimização da solubilidade nanotubo/matriz e a adesão ainda são considerados parâmetros críticos.

A dispersão uniforme é considerada um ponto crítico devido ao reforço dos materiais poliméricos, visto que os CN apresentam-se agrupados em feixes.

Alguns estudos permitiram concluir que a adição de pequenas percentagens de NC em matrizes poliméricas como a PVA ou PS levam a um aumento que ronda os 40% na tensão elástica e a um aumento que ronda os 25% na resistência à tracção.

Assim sendo, a performance dos materiais compósitos dos nanotubos de carbono é considerada cerca de 10 vezes melhor do que se pode observar nos compósitos das fibras de carbono convencionais, relativamente à mesma carga. Deve-se no entanto ter em consideração o desenvolvimento de técnicas que possibilite a melhor ligação dos nanotubos à matriz polimérica.

O processamento e manipulação dos CN individuais é limitada pela sua insolubilidade. É possível obter-se melhores resultados com o chamado recobrimento dos CN com polímeros, permitindo assim obter arranjos supramoleculares nanotubo-polímero. Alguns estudos relatam este caso como modificações químicas nos CN, o que pode encurtar o caminho até à sua aplicação, inclusive na preparação de compósitos.

Estas modificações orgânicas que os CN apresentam englobam longas cadeias de reações de radicais, polímeros, alquilas entre outras o que possibilitam a obtenção de nanotubos funcionais, podendo levar a materiais com uma boa solubilidade [44-47].

2 Parte Experimental

2.1 Equipamento

Para a execução deste estudo utilizou-se um potencióstato/galvanóstato de marca AUTALAB modelo PSTAT 12, sendo o sistema de aquisição e tratamento de dados General Purpose Electrochemical System (GPES) versão 2.9 (ver figura 2.1).



Figura 2.1– Fotografia do Autolab utilizado

Este equipamento é complementado por um sistema de três eletrodos, o eletrodo de referência, o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar de platina.

Eletrodo de referência: eletrodo de Ag/AgCl, sendo que todos os potenciais relacionados com o presente estudo são referentes a este eletrodo.

Eléctrodo de trabalho: eléctrodo comercial de carbono vítreo (BioanalyticalSystem), com diâmetro de 3,0 mm. Este eléctrodo foi utilizado como base para as modificações necessárias para a construção do sensor seletivo para Norfloxacina.

Eléctrodo auxiliar: eléctrodo comercial de platina adquirido da Metrohm, com diâmetro de 3,0 mm.

Relativamente às medições de pH estas foram realizadas através de um Phmetro (GLP22, Crison) com um eléctrodo de vidro.

Utilizou-se uma balança analítica (Mettler Toledo) com uma precisão de 0.00001 g para efectuar as pesagens dos compostos e micropipetas Gilson Medical Electronics (pipetman R) de 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl e 5000 µl para efectuar as respectivas medições de volumes.

Para a limpeza dos eléctrodos foi utilizado um tecido de polimento (Buehler MicroCloth), composto por fibras sintéticas (Rayon).

Foram ainda utilizados equipamentos de ultra-sons Crest e Sonorez Digital 10P Bandelin na limpeza dos eléctrodos e para auxiliar na dissolução das diversas soluções preparadas, respectivamente.

Recorreu-se a um sistema de purificação de modelo Elix da Millipore, para a obtenção de água ultrapura e o sistema de ultrapurificação de água Millipore Simplicity 185 com propriedades específicas e com uma resistividade a 18,2 Mohm.

2.2 Reagentes e soluções

Neste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: ácido sulfúrico 96% (Panreac); hidróxido de sódio (Panreac); pyrrol 98% (Sigma-Aldrich); peróxido de hidrogénio; acetonitrilo 99,8% (Merck); metanol 99,8% (Prolabo); dihidrogenofosfato de potássio (Riedel-de Haën); hidrogenofosfato de dipotássio (Riedel-de Haën); norfloxacina (Sigma-Aldrich); azoto 5,0 (grau de pureza 99,999%, LINDE, Portugal); Glucose anidra; ácido ascórbico; ureia.

Soluções mãe da Norfloxacina foram preparadas com uma concentração $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L numa solução de 50% de acetonitrilo, 50% de água ultrapura e com 150 µl de ácido sulfúrico 0,5 mol/L. A partir desta solução foram preparadas diariamente soluções de trabalho com diferentes concentrações de Norfloxacina. Foram preparadas soluções aquosas de ácido sulfúrico de concentração 0,5 mol/L (para realização de medições voltamétricas) e NaOH

0,1mol/L (para extracção do fármaco do sensor). Também foram preparadas soluções tampão fosfato 0,1 mol/L com diferentes valores de pH (para realização de medições voltamétricas)

2.3 Preparação do sensor

A preparação do sensor seletivo para a detecção de Norfloxacinina foi conseguida seguindo-se os seguintes passos (esquematisados na figura 2.2): 1) deposição nanotubos de carbono na superfície de um eléctrodo de carbono vítreo (previamente limpo); 2) eletropolimerização; 3) remoção da molécula molde (norfloxacinina).

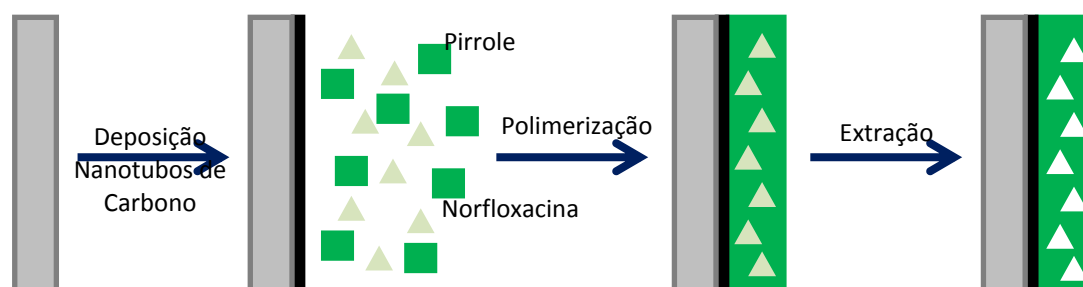


Figura 2.2– Esquema da preparação do sensor.

2.3.1 Limpeza dos eléctrodos

Em qualquer trabalho em que se utilize um eléctrodo de carbono vítreo, é necessário proceder-se a um processo de limpeza previamente à sua utilização e/ou modificação. Este procedimento é fundamental para assegurar a qualidade e a reprodutibilidade nas medições realizadas. Deste modo procedeu-se a uma limpeza mecânica seguida de uma limpeza eletroquímica. Este procedimento foi efetuado sempre que um novo sensor foi preparado.

A limpeza mecânica consiste no polimento manual dos eléctrodos de carbono utilizando um tecido de polimento juntamente com uma solução de alumina diluída. Sendo que a solução de alumina deve ser utilizada consoante as suas características, na sequência 0,3 μm e 0,05 μm , respectivamente. O polimento da superfície do eléctrodo deve ser executado até que a sua superfície apresente um aspeto espelhado. No fim deste processo de polimento, os eléctrodos são passados por água ultra pura e levados ao ultra-som para remover as partículas residuais de alumina.

Para finalizar a limpeza, utilizou-se um processo eletroquímico que consiste na imersão do eléctrodo na célula voltamétrica contendo uma solução de ácido sulfúrico 0,5 mol/L e executados varrimentos cíclicos entre -0,1 e +1,5 V até conseguir obter um voltamograma estável.

2.3.2 Deposição de Nanotubos de Carbono de paredes Múltiplas (MWNT)

Inicialmente foi preparada uma solução de nanotubos (num tubo eppendorf de 1mL) de concentração 1mg/mL em DMF. A solução é colocada no ultra-som durante 2h. Posteriormente, prepara-se uma nova solução a partir da solução inicial, diluindo 10x a solução em água/DMF (50:50). Esta solução foi colocada no ultra-som por cerca de 10min, até se apresentar como uma solução homogénea. Esta solução foi utilizada para fazer a deposição dos MWNT na superfície do eléctrodo, colocando-se uma gota de 5 μ L e deixando secar na estufa a uma temperatura de 50 °C durante 20 min. Quando o eléctrodo apresentar uma superfície bem seca é colocada a gota seguinte. A colocação de gotas pode ser repetida várias vezes, até se obter uma modificação com as características desejadas. É importante referir que o eléctrodo deve estar posicionado na vertical para que a solução de nanotubos seja colocada sobre o filme de forma uniforme.

2.3.3 Preparação Polímero Molecularmente Impresso (MIP)

Seguidamente à modificação do eléctrodo com os MWNT, procedeu-se à preparação do polímero seletivo por eletropolimerização, a partir de uma solução, composta por uma mistura de fármaco (NFX) com o polímero (pyrrol) numa solução 50:50 de acetonitrilo e água contendo ácido sulfúrico, de acordo com os dados da Tabela 2.1.

Tabela 2.1— Solução usada na eletropolimerização para obtenção do MIP

Composição da solução	Concentração
Norfloxacin	$1,0 \times 10^{-2}$ mol/L
Pyrrol	18 μ l
Ácido Sulfúrico	150 μ l
Água/acetonitrilo (50:50)	Água/acetonitrilo (50:50)

A obtenção do MIP foi conseguida recorrendo à voltametria cíclica de acordo com as condições especificadas na tabela 2.2

Tabela 2.2 — Condições voltamétricas usadas na eletropolimerização do MIP

Condições de Polimerização	
Potencial de condicionamento	-1 V
Duração	60 seg
Equilíbrio	5
Número de ciclos	10 ciclos
Potencial inicial	0 V
Potencial final	1,3 V
Incremento	0,00488 V
Velocidade de varrimento	0,1 V/s

Posteriormente a este processo, procedeu-se a um processo de sobreoxidação do polímero obtido. Este procedimento tem como objetivo a estabilização do polímero. Para isso, coloca-se o eletrodo, já modificado com os MWNT e com o polímero, numa solução de tampão fosfato 0,1mo/L de pH=4 e procede-se a um conjunto de varrimentos cíclicos de acordo com os dados da tabela 2.3.

Tabela 2.3— Condições de sobreoxidação

Condições de Polimerização	
Potencial inicial	0
Potencial final	1,5
Número de ciclos	10 ciclos
Incremento	0,00488 V
Velocidade de varrimento	0,1 V/s

Composição do eletrólito	
Tampão fosfato pH 4	0,5 M

Para finalizar, é necessário remover o template (NFX) da matriz polimérica, de modo a obter um polímero com as cavidades específicas para a nossa molécula. Assim sendo o eletrodo foi colocado numa solução aquosa de NaOH a uma concentração de 0,1M juntamente com metanol a uma proporção de 50:50, durante 40 minutos.

2.3.4 Preparação Polímero Não Molecularmente Impresso (NIP)

Foi ainda preparado um sensor de controlo através da obtenção de um polímero não molecularmente impresso (NIP). A preparação deste polímero é realizada nas mesmas condições em que se preparou o MIP, excetuando a presença do template (neste caso a NFX) na solução usada na polimerização, de acordo com as tabelas 2.4 e 2.5.

Tabela 2.4— Solução usada na eletropolimerização para obtenção do NIP

Composição da solução	Concentração
Pyrrol	18 µl
Ácido Sulfúrico	150 µl
Solvente	Água/acetoneitrilo (50:50)

Tabela 2.5— Condições voltamétricas usadas na eletropolimerização do MIP

Condições de Polimerização	
Potencial de condicionamento	-1 V
Duração	60 seg
Equilíbrio	5
Número de ciclos	10 ciclos
Potencial inicial	0 V
Potencial final	1,3 V
Incremento	0,00488 V
Velocidade de varrimento	0,1 V/s

2.4 Medições Eletroquímicas

Na utilização do sensor seletivo, a NFX obedeceu a um procedimento de 3 etapas: incubação, medição e extração.

1. Incubação: introdução do sensor por períodos de tempo bem definidos na solução de NFX
2. Medição voltamétrica: após a incubação o sensor é introduzido na célula voltamétrica, contendo tampão fosfato 0,1mol/L pH=4 procedendo-se à oxidação das moléculas de NFX por voltametria de onda quadrada, com um varrimento entre 0,0 e +1,4V.

Extração: Após análise é necessário efetuar a remoção das moléculas de NFX do sensor antes de se poder prosseguir para outra análise. Este procedimento foi realizado colocando o sensor numa solução 50:50 de metanol e NaOH 0,1mol/L durante 40 minutos.

2.5 Preparação das Amostras

Finalmente o sensor para a deteção da NFX é utilizado em amostras de urina e águas. As amostras de urina foram recolhidas em frascos esterilizados. As amostras de urina foram previamente centrifugadas a 2500 rpm, durante 30 minutos, para que sejam eliminados certos interferentes e para que haja precipitação de proteínas. As amostras de urina foram diluída a 10%. Deste modo preparou-se uma solução com 10% de urina e 90% solvente (água/acetonitrilo e ácido). Foram ainda preparadas amostras de igual modo com urina dopada com 0,1 mM de NFX.

Relativamente às amostras de água da torneira e do rio Lima, estas foram diluídas 50% no solvente de incubação. Estas amostras forma dopadas 10 μ M do fármaco.

3 Resultados e Discussão

3.1 Limpeza do eléctrodo de trabalho (carbono vítreo)

Previamente a qualquer utilização ou modificação de um eléctrodo de carbono vítreo é necessário efetuar uma limpeza, visto que a qualidade e a reprodutibilidade das medições dependem deste processo. Assim sendo, foi executada uma limpeza mecânica que consiste na fricção de um eléctrodo de carbono vítreo sobre um tecido de carmuça. A limpeza mecânica possui duas etapas, na primeira os eléctrodos são movimentados em forma de 8 sobre o tecido de carmuça em alumina 0,3 μm , a segunda etapa consiste em movimentar os eléctrodos igualmente em forma de 8 sobre o tecido mas em alumina 0,05 μm . A superfície do eléctrodo deve ser enxaguada por água ultrapura após cada etapa e o processo de limpeza mecânica deve ser efectuado até que a superfície do eléctrodo apresente um aspeto espelhado.

Seguidamente, procede-se a uma limpeza eletroquímica, que consiste na execução de uma série de varrimentos cíclicos numa solução 0,5M de H_2SO_4 até a obtenção de um voltamograma estável. Na figura 3.1 está representado um voltamograma final obtido após a limpeza de um eléctrodo de carbono vítreo.

Quando a superfície do eléctrodo não se encontra totalmente limpa e espelhada pode-se verificar o aparecimento de picos, durante o varrimento cíclico em ácido, devido ao fato de alguns compostos poderem ainda estar adsorvidos à superfície do eléctrodo. Nestes casos, é necessário repetir o processo mecânico até que a superfície do eléctrodo se encontre totalmente limpa, sem que seja possível a deteção de qualquer pico durante a limpeza eletroquímica.

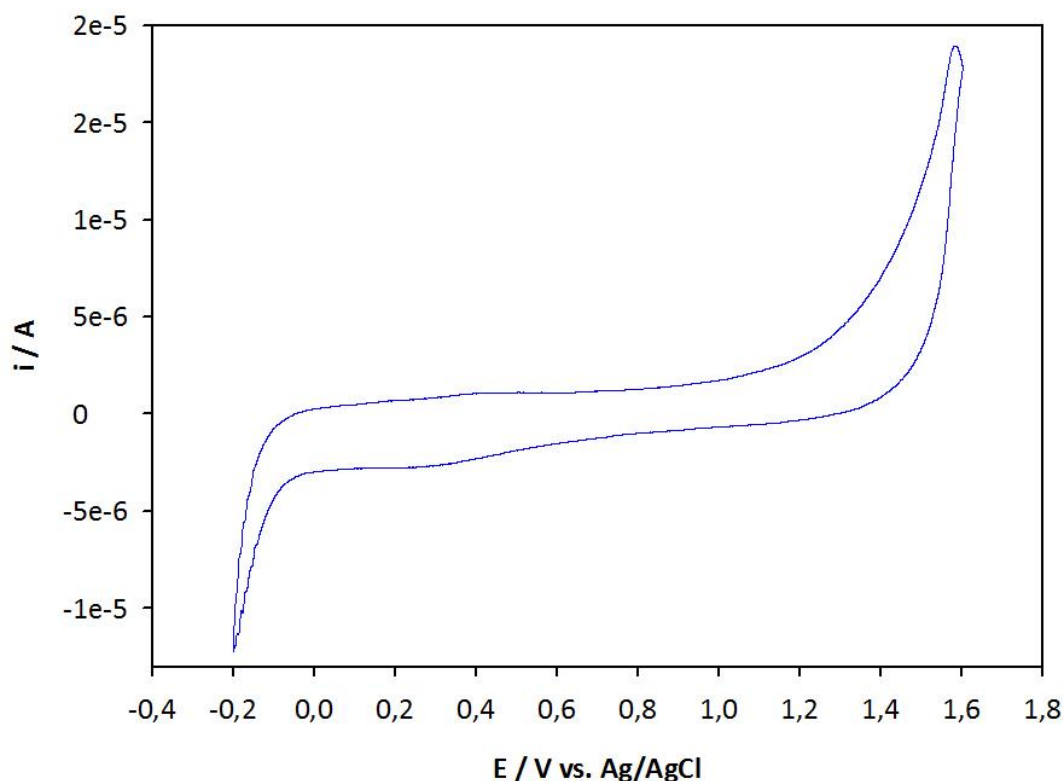


Figura 3.1– Voltamograma cíclico de uma limpeza eletroquímica de um elétrodo de carbono vítreo em H_2SO_4 , obtido ao fim de 20 ciclos. Gama de potenciais: -0,2 a 1,6 V; Velocidade de varrimento: 100mV/s.

3.2 Preparação do Mip e Nip

Para a obtenção de um sensor seletivo recorreu-se à tecnologia de polímeros molecularmente impressos (MIP). Uma das maiores dificuldades na preparação de um sensor químico consiste na transdução, ou seja, na ligação entre o sinal analítico e o elemento de reconhecimento. Neste trabalho utilizou-se um eletropolímero condutor, o pirrol, que funciona simultaneamente como elemento seletivo e de transdução. Para isso, recorreu-se a um procedimento de eletropolimerização, que permite a formação de um polímero na superfície de um elétrodo de carbono de forma simples, rápida e de fácil controlo. Ao realizar a polimerização na presença da Norfloxacin (NFX), foi possível a obtenção de um polímero seletivo. Este tipo de polimerização foi obtida por voltametria cíclica a partir de uma solução contendo pirrol, NFX, eletrólito de suporte e solvente. Na figura 3.2 estão representados os 10 voltamogramas cíclicos obtidos durante a preparação do MIP.

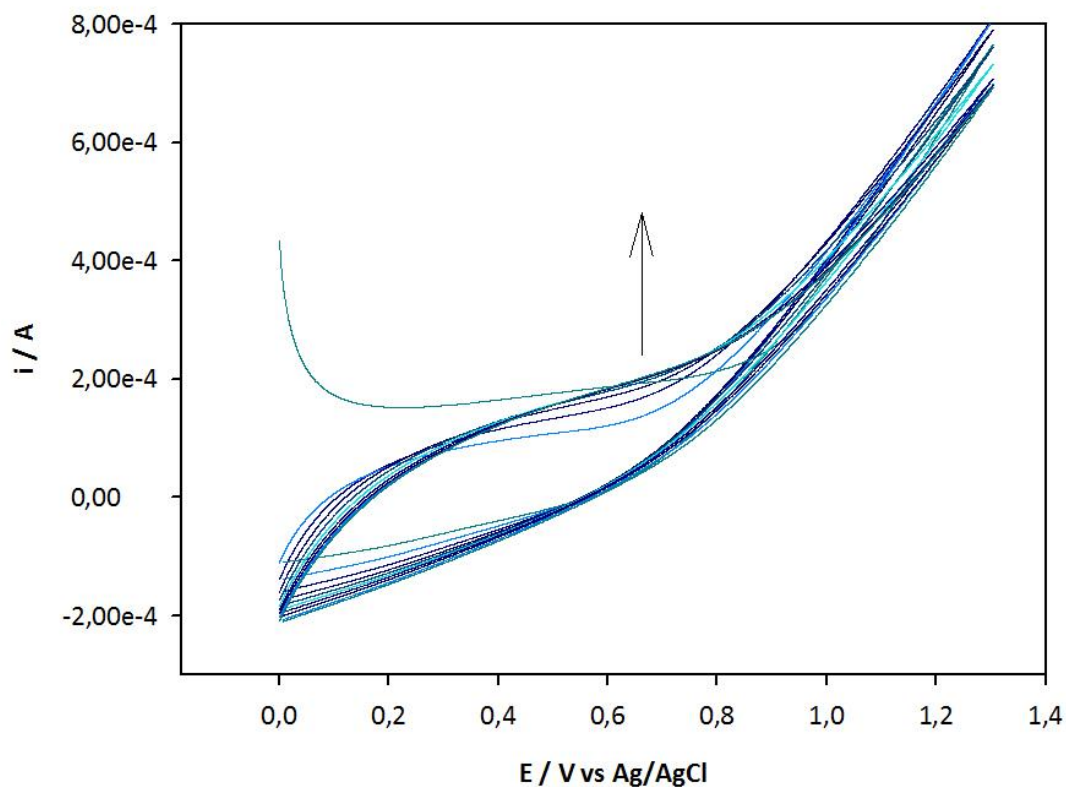


Figura 3.2 – Preparação do MIP por eletropolimerização. Número de ciclos: 10; Gama de potenciais -0,2 a 1,3V; Velocidade de varrimento: 100mV/s; Solução de polimerização: 0,5M H₂SO₄, 10mM pirrol, 10mM Norfloxacin em água/acetonitrilo (50:50)

Verifica-se que o polímero que se forma à superfície do eletrodo de carbono vítreo aumenta com o aumento do número de ciclos e com a quantidade do polímero encontrado na solução de polimerização. Na figura 3.2 pode-se verificar um aumento da espessura em toda a gama de potenciais, ou seja o polímero é formado camada a camada.

Como forma de controlo preparou-se um polímero não molecularmente impresso (NIP) seguindo um procedimento idêntico mas sem a presença do “template” (NFX) durante a polimerização. Com isto obtém-se um polímero que não terá cavidades específicas para as moléculas de NFX. Deste modo a comparação entre a resposta de um sensor MIP e um NIP permitirá confirmar a formação de cavidades específicas no MIP.

Durante os voltamogramas cíclicos de preparação do NIP, verifica-se que o aumento da espessura em toda a gama de potenciais não é tão elevado como o que ocorre no MIP. Este fato pode estar relacionado com a incorporação de moléculas eletroativas de NFX no polímero,

sendo o primeiro indicador positivo de sucesso na preparação do MIP. Na figura 3.3 estão ilustrados os voltamogramas finais obtidos na preparação do MIP e NIP.

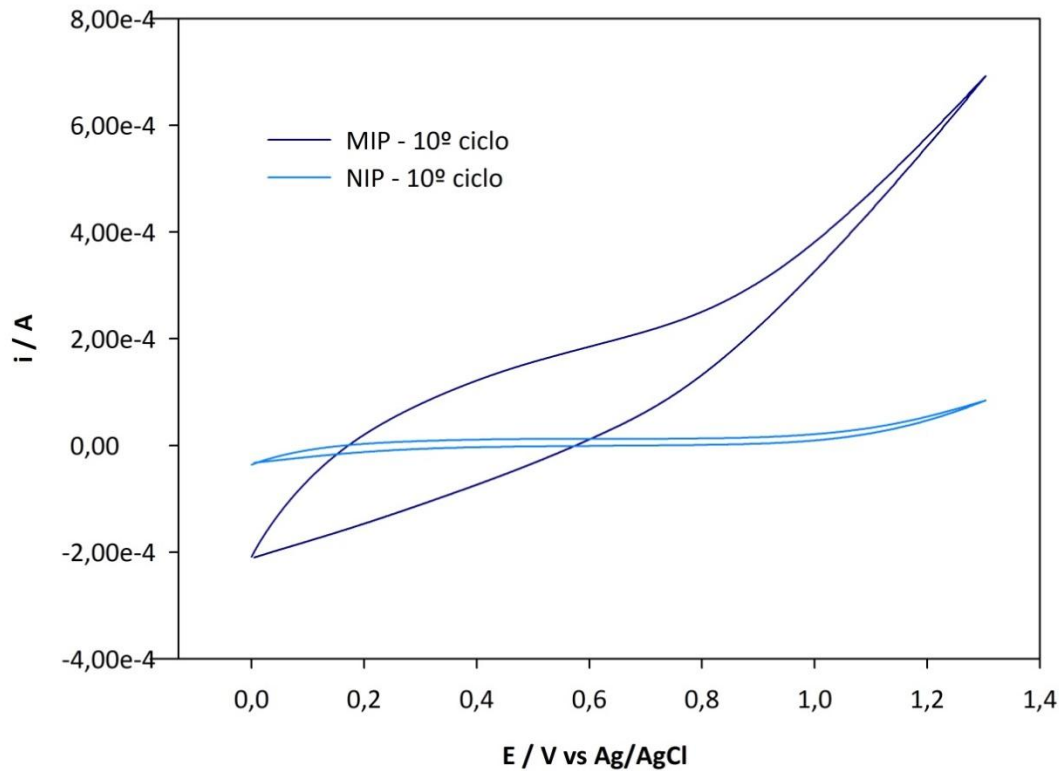


Figura 3.3 – Voltamogramas cíclicos finais da polimerização do MIP e NIP: Número de ciclos: 10; Gama de potenciais 0,0 V a 1,3 V; Velocidade de varrimento: 100mV/s.

É importante referir que a preparação do MIP depende do número de ciclos realizados, sendo que neste estudo foram fixados 10 ciclos de voltametria cíclica. Verificou-se que para um menor número de ciclos obtinha-se uma menor performance (menor intensidade do pico de NFX). Por outro lado, à medida que se aumenta o número de ciclos é formado um polímero cada vez mais espesso e com mais moléculas de NFX. No entanto, isto pode dificultar a remoção da NFX, pois quanto maior a espessura de polímero mais difícil será remover as moléculas em zonas mais profundas. Além disso, um polímero demasiado espesso, pode soltar-se mais facilmente da superfície do eletrodo, devido ao seu maior peso. Verificou-se ainda que para polimerizações com mais de 10 ciclos não se conseguia manter o polímero na superfície por tempos prolongados, pois este soltava-se com facilidade.

Após polimerização há necessidade da utilização de um procedimento de estabilização do polímero formado na superfície do eletrodo e a obtenção de um bom sinal analítico. Este processo é denominado de sobreoxidação do pirrol e é utilizado com frequência na preparação deste tipo de sensores. Deste modo colocou-se o sensor numa solução de PBS 0,1M pH=4 procedeu-se à realização de 10 varrimentos cíclicos entre 0V e +1,5V. A sobreoxidação apesar de diminuir um pouco a condutividade do polímero permite a sua estabilização. Além disso este procedimento auxilia a remoção das moléculas de NFX incorporadas durante a polimerização, permitindo formar cavidades específicas. Na figura 3.4 estão representados os voltamogramas da sobreoxidação. É possível verificar-se uma diminuição do sinal com o aumento do número de ciclos, ao contrário do que acontece durante processo de polimerização. Esta diminuição está relacionada com alguma perda de condutividade e com a remoção de moléculas de NFX da matriz polimérica.

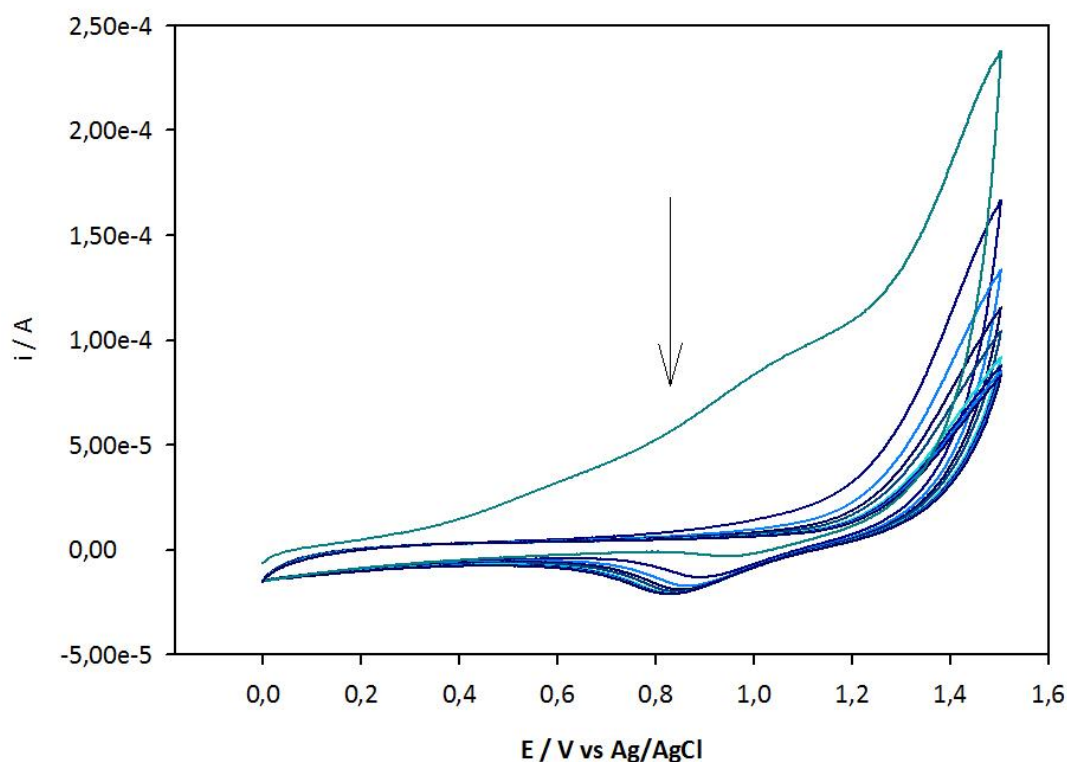


Figura 3.4– Sobreoxidação do MIP após polimerização: Número de ciclos: 10; Gama de potenciais 0,0 V a 1,3 V; Velocidade de varrimento: 100mV/s; eletrólito de suporte: tampão PBS 0,1 M pH=4.

A remoção completa das moléculas de NFX é conseguida por extração, mergulhando o sensor numa solução de metanol e NaOH 0,1M (50:50) durante 40 minutos. Após este procedimento o sensor está pronto para ser utilizado na deteção seletiva da NFX.

3.3 Comportamento eletroquímico e otimização do sensor

Tal como descrito no Capítulo 2, a utilização do sensor seletivo para a deteção voltamétrica da NFX segue um procedimento de 3 passos: 1) incubação. 2) deteção voltamétrica, 3) extração.

Inicialmente procedeu-se à otimização e caracterização da resposta voltamétrica.

3.3.1 Deteção voltamétrica da NFX

O primeiro passo consistiu na comparação entre o MIP e o NIP, uma vez que este estudo é fundamental para confirmar o sucesso da preparação de um sensor seletivo. Deste modo, incubou-se o MIP e o NIP numa solução de NFX 1mM por um período de 10 min. De seguida procedeu-se às medições numa solução H_2SO_4 0,1M por voltametria de onda quadrada com uma frequência de 25 Hz. De igual modo fez-se uma leitura do MIP após remoção da NFX. Os resultados obtidos estão representados na figura 3.5

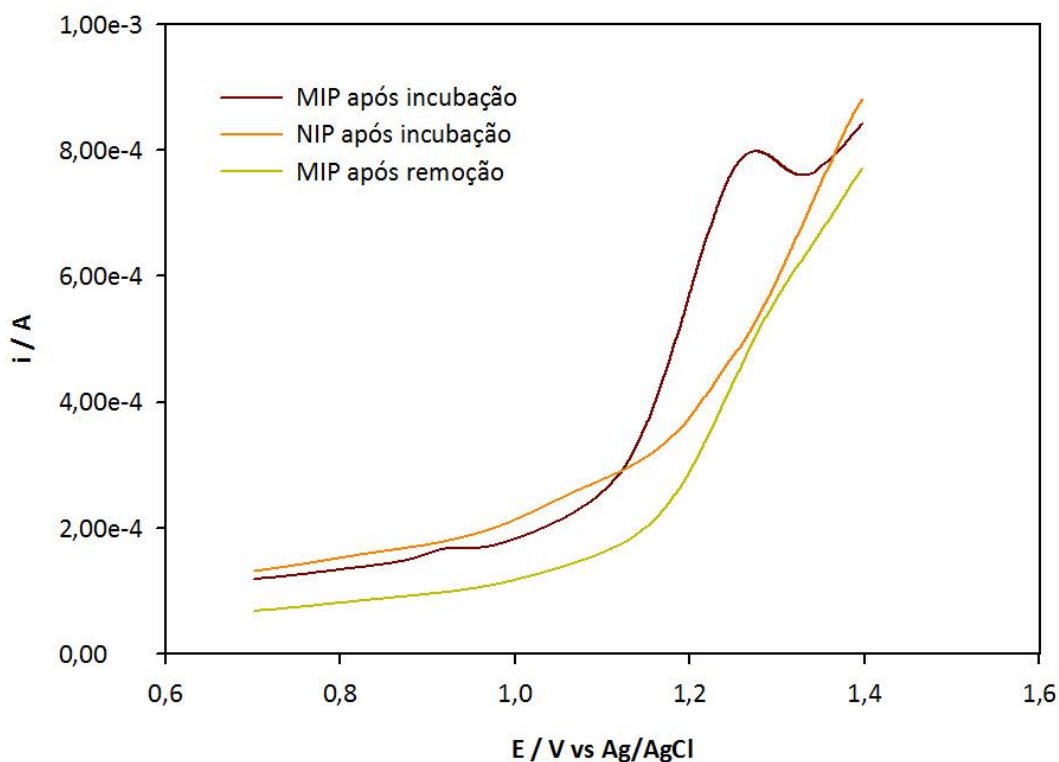


Figura 3.5– Voltamogramas obtidos para o MIP e NIP após 10 min de incubação numa solução de NFX 1mM. Eletrólito de Suporte: H₂SO₄ 0,1M; Voltametria de onda quadrada a 25Hz.

Verifica-se claramente no caso do MIP um pico próximo dos 1,25V relativo à oxidação das moléculas de NFX, enquanto não se observa nenhum pico quando se usa o NIP. Estes resultados permitem confirmar a formação de cavidades no MIP e a capacidade deste para se ligar com as moléculas de NFX, ao contrário do que acontece com o NIP. É importante fazer notar que aquando da leitura voltamétrica as únicas moléculas de NFX presentes são as que ficaram adsorvidas no sensor durante a incubação, visto que na célula eletroquímica apenas temos eletrólito de suporte. No caso do NIP, o fato de este não possuir cavidades, não permitiu que as moléculas de NFX fossem adsorvidas e consequentemente não é possível haver medição do sinal analítico. Nesta fase do trabalho estudou-se também qual o meio mais adequado para a medição voltamétrica da oxidação da NFX. Os resultados obtidos foram comparados com medições em tampão fosfato pH 4, 7 e 10. Apesar de não se verificar diferenças muito significativas na intensidade de corrente entre as leituras em meio ácido e nos meios com pH 4 e 7, o melhor resultado verificou-se para o pH 4. Além disso, para este meio o potencial de oxidação baixou para cerca de 1,05V. Deste modo as medições foram posteriormente realizadas neste meio.

Um dos pontos importantes neste trabalho foi a utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) de forma a aumentar a sensibilidade da resposta analítica. Se por um lado a utilização de polímeros impressos visava garantir a seletividade, a modificação com MWCNT antes da polimerização, visava aumentar a área de polimerização e a condutividade de modo a permitir uma amplificação do sinal analítico para a mesma concentração. Deste modo, testou-se a eficácia da presença de MWCNT na resposta voltamétrica da NFX. Com essa finalidade prepararam-se dois sensores usando o procedimento de polimerização anteriormente descrito, sendo que um dos sensores foi modificado previamente com MWCNT e outro não. Após obtenção dos sensores, foram incubados durante 10 minutos numa solução 0,1mM de NFX e procedeu-se à leitura voltamétrica. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 3.6.

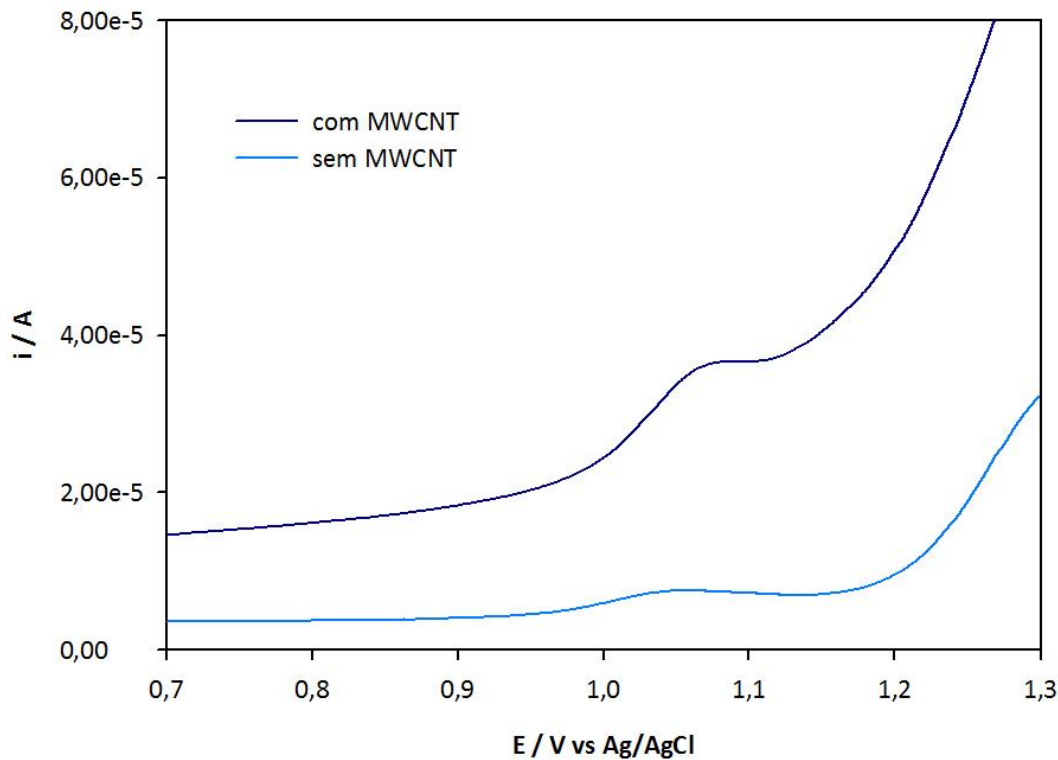


Figura 3.6– Voltamogramas obtidos para sensores com e sem MWCNT após 10 min de incubação numa solução de NFX 1mM. Eletrólito de Suporte: PBS 0,1M pH 4; Voltametria de onda quadrada a 25Hz.

Os resultados obtidos permitem verificar que há um aumento do sinal analítico quando o sensor é modificado previamente com MWCNT. O aumento foi de cerca de três vezes superior comparativamente com o sinal obtido para o sensor sem MWCNT. Deste modo confirma-se que é possível aumentar a sensibilidade do método desta forma.

A partir destes resultados procedeu-se à otimização da quantidade de nanotubos que deve ser colocada sobre a superfície do elétrodo de carbono vítreo, sendo que esta irá interferir com a sua performance durante todo o processo de deteção do fármaco. Tipicamente os MWCNT são dispersados num solvente como DMF, numa concentração 1mg/mL e aplicados na superfície do elétrodo. Contudo, para esta concentração não se verificaram resultados satisfatórias tanto em termos de estabilidade da modificação (facilmente caíam) como no aumento da resposta analítica. Isto pode dever-se ao fato de não se ter conseguido obter uma dispersão homogénea. Desta forma diluiu-se esta solução para uma concentração dez vezes inferior em água/DMF (50:50), de modo a garantir uma dispersão mais homogénea e procedeu-se à modificação de superfície do elétrodo por deposição e secagem em estufa a 50°C. De modo a garantir uma boa deposição e estabilidade em vez de depositar 20 ou 30 µL da solução no elétrodo, realizaram-se variações na deposição de 5µL. Depositou-se, secou-se em estufa, voltou a fazer-se nova deposição e nova secagem até atingir o número de deposições desejado. Na figura 3.7 estão representados os valores obtidos para a deteção de NFX usando elétrodos modificados com diferentes deposições de MWCNT, entre 2 e 6 deposições.

Ao analisar os resultados obtidos verifica-se que a aplicação de 2 deposições não contribui para um aumento significativo da área de polimerização, diminuindo a deteção do pico de NFX. Posteriormente, foram realizadas 4 deposições de nanotubos e verificou-se que o sinal analítico aumentou consideravelmente. Contudo, para o sensor com 6 deposições houve uma diminuição significativa do sinal comparado com o caso anterior. Verificou-se ainda que neste caso os MWCNT facilmente caíam do elétrodo. Nesse caso, provavelmente estão a ser colocados demasiados MWCNT, de modo que a deposição fique demasiado “espessa”, fato que limita a estabilidade e ao mesmo tempo não permite uma tão boa resposta analítica. Foram assim seleccionadas 4 deposições de MWCNT.

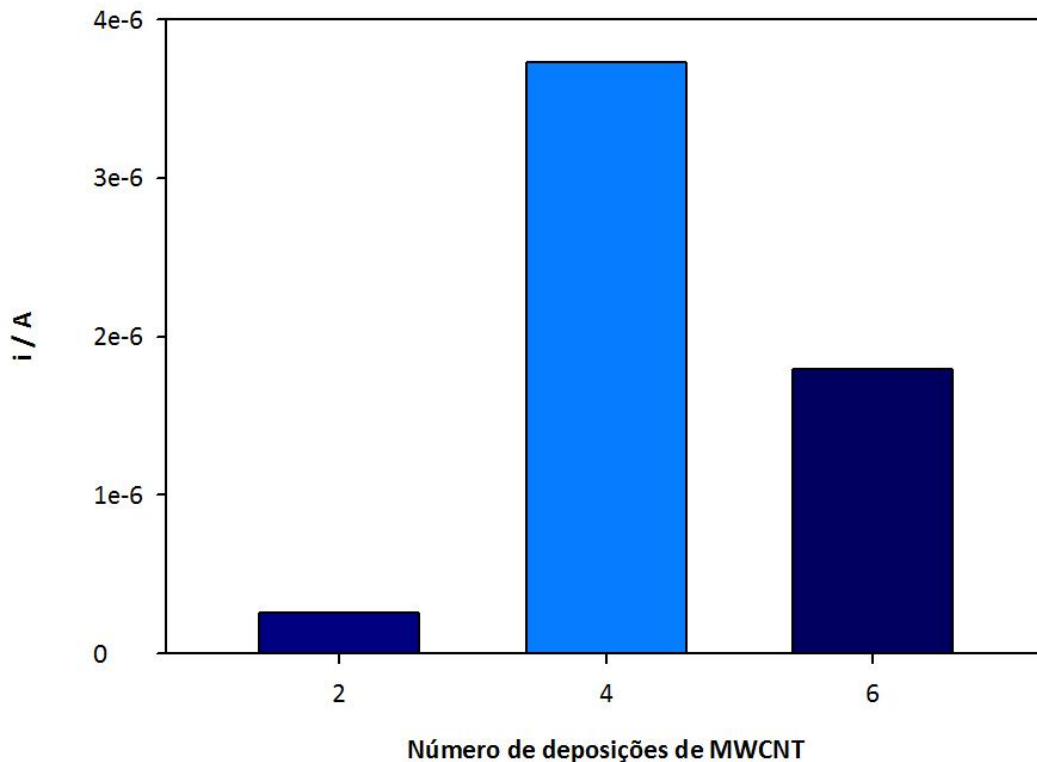


Figura 3.7– Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do número de deposições de MWCNT. 10 Minutos de incubação numa solução de NFX 1mM; Eletrólito de Suporte: PBS 0,1M pH 4; Voltametria de onda quadrada a 25Hz.

3.3.2 Tempo de incubação

Procedeu-se à otimização das condições na fase de incubação. As soluções de NFX usadas para incubação foram preparadas em 50% de acetonitrilo, 50% de água ultrapura e 150 μ l de ácido sulfúrico 0.5 mol/L. Estas são as condições iguais às usadas durante a polimerização (exetando a presença do pirrol). A presença de acetonitrilo é fundamental para auxiliar a dissolução de NFX. O ácido é fundamental para garantir a adesão das moléculas do fármaco e desta forma permitir a ligação com o polímero. Verificou-se que em meios não ácidos, não havia qualquer incubação da NFX, fato que levou a concluir que só neste meio havia possibilidade de estabelecer uma ligação entre o fármaco e o polímero. A fase de incubação realizou-se sempre com agitação magnética.

Um fator fundamental no procedimento de incubação é o tempo. Deste modo, o sensor foi colocado numa solução de concentração 1mM de NFX durante diferentes períodos de tempo. Inicialmente o sensor foi imerso na solução durante 2 min, registando-se de seguida o voltamograma. Após a leitura e remoção do fármaco, o sensor foi novamente imerso na solução

para incubação durante 4 min. Repetiu-se o procedimento aumentando o tempo sucessivamente até a obtenção de um valor máximo para o pico. Os resultados obtidos estão expressos nas Figuras 3.8 e 3.9.

Ao analisar o estudo do tempo de incubação verificou-se um aumento da intensidade do pico do fármaco à medida que o tempo de incubação aumenta, atingindo-se o máximo pelos 10 minutos de incubação. Existe um grande aumento entre os 2 e os 4 minutos e depois um ligeiro aumento e estabilização até aos 10 minutos. A partir deste ponto atinge-se o máximo e esperava-se uma estabilização do sinal. Contudo para 12 minutos de incubação verificou-se uma descida. Isto indica que provavelmente a partir deste ponto, ao invés de haver uma acumulação de NFX no polímero pode começar a haver libertação.

Assim sendo o tempo ótimo selecionado para a fase de incubação foi de 10 minutos.

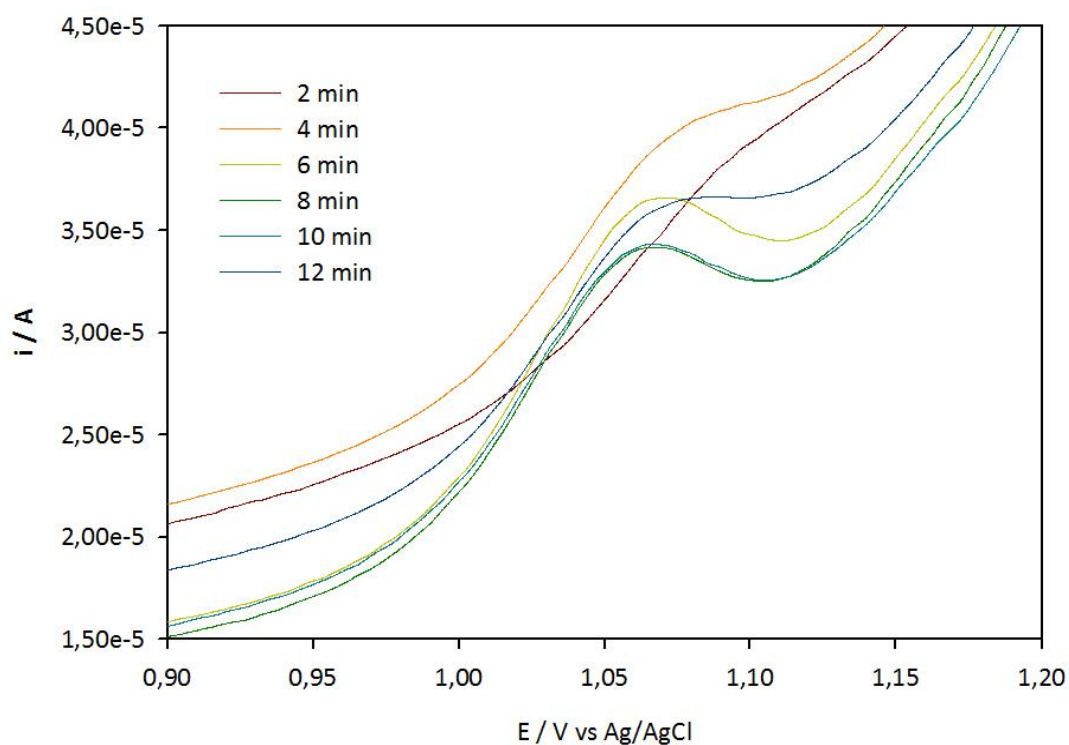


Figura 3.8– Voltamograma obtido na incubação em diferentes períodos de tempo numa solução de NFX 1mM. Eletrólito de Suporte: PBS 0,1M pH 4; Voltametria de onda quadrada a 25Hz.

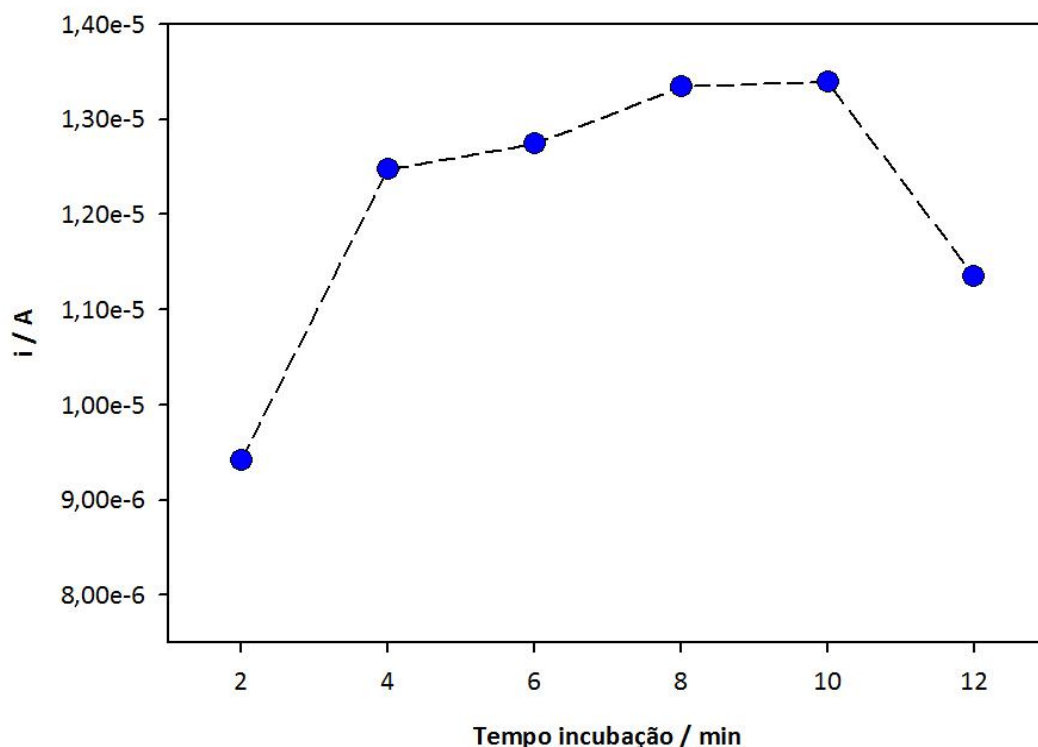


Figura 3.9 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do tempo de incubação numa solução de NFX 1mM.

3.3.3 Tempo de remoção

Devido ao tipo de procedimento seguido para utilização do sensor, após cada análise há necessidade de remover todas as moléculas de NFX do polímero antes de se proceder a uma nova análise. Este processo visa garantir que todas as cavidades do polímero ficam livres antes de se realizar a próxima incubação. Ainda que durante a leitura voltamétrica (oxidação de NFX) algumas moléculas de fármaco se possam libertar, verificou-se que a maioria se mantinha no sensor. Realizando uma incubação sem realizar nenhum procedimento de remoção, não se verificava nenhum pico de NFX. O procedimento de remoção mais usual para este tipo de sensor é a extração por solvente. Foram testados vários solventes, tendo-se verificado que o melhor solvente de remoção para a NFX é uma solução de NaOH 0,1M e metanol (50:50).

Seguidamente estudou-se o tempo necessário para garantir a remoção completa das moléculas de fármaco. Para isso, colocou-se o sensor numa solução de NFX 1mM durante 10 minutos de incubação. De seguida, colocou-se o sensor na solução de remoção durante 5 minutos e fez-se uma leitura voltamétrica, tendo-se verificado um pequeno pico de NFX. Com

isto conclui-se que ao fim de 5 minutos não havia remoção completa. Repetiu-se o procedimento para períodos de tempo crescente até não se verificar nenhum pico de NFX, fato que garantiria a remoção completa. Na figura 3.10 estão representadas as intensidades de corrente dos picos registados em função do tempo de remoção. Na figura 3.10 foi ainda assinalada a percentagem de remoção correspondente a cada pico.

Em termos de valores absolutos, verifica-se um decréscimo acentuado do pico na fase inicial, atingindo-se a remoção completa a partir dos 40 minutos. No entanto quando analisamos valores em termos de percentagem de remoção verifica-se que logo aos 5 minutos a remoção é muito alta, cerca de 93%. Embora exista uma remoção muito grande inicialmente, a dificuldade maior está em remover os restantes 7%. Apenas a partir dos 30 minutos se garante uma remoção igual ou superior a 99%.

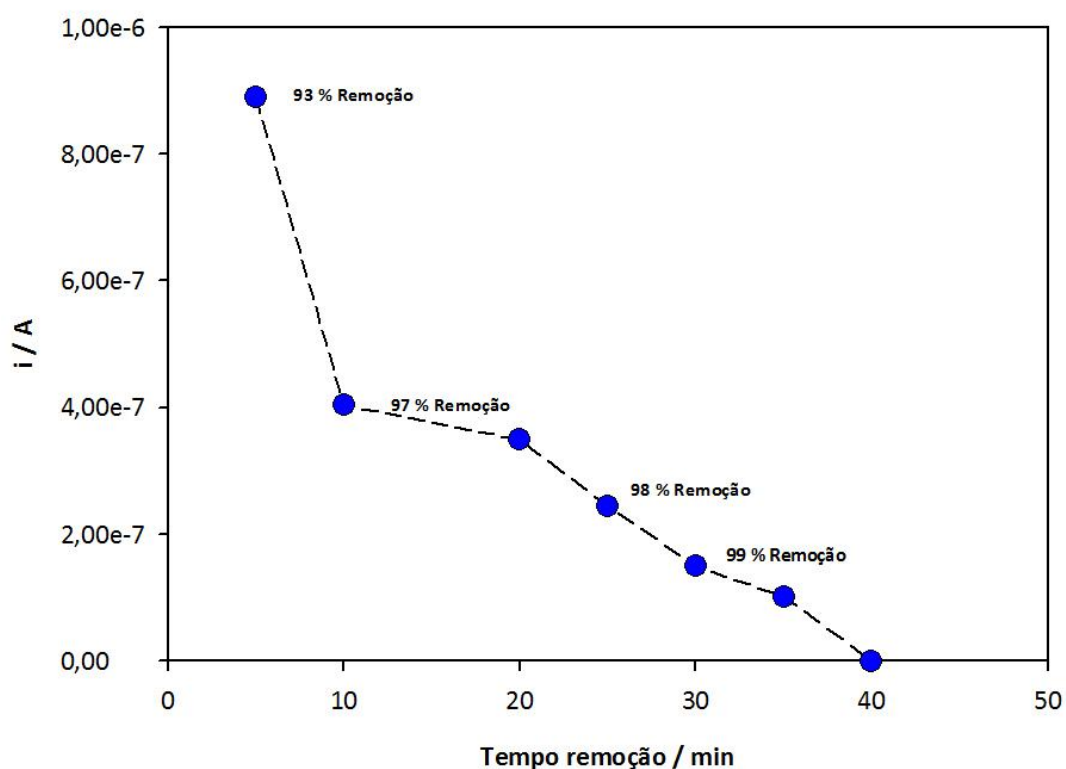


Figura 3.10– Gráfico da variação da intensidade do pico em função do tempo de remoção em solvente, após 10 minutos de incubação numa solução de NFX 1mM.

3.4 Performance Analítica

Seguidamente estudou-se a performance da metodologia para determinação da NFX usando o sensor desenvolvido.

3.4.1 Curva de Calibração

De modo a avaliar a resposta do sensor em função da concentração de NFX, procedeu-se à incubação em diferentes concentrações de NFX (entre 0,1 e 8 μM) durante 10 minutos e efetuou-se a leitura voltamétrica nas condições descritas anteriormente. A partir da intensidade do pico versus a concentração da NFX foi construída uma curva de calibração, representada na figura 3.11.

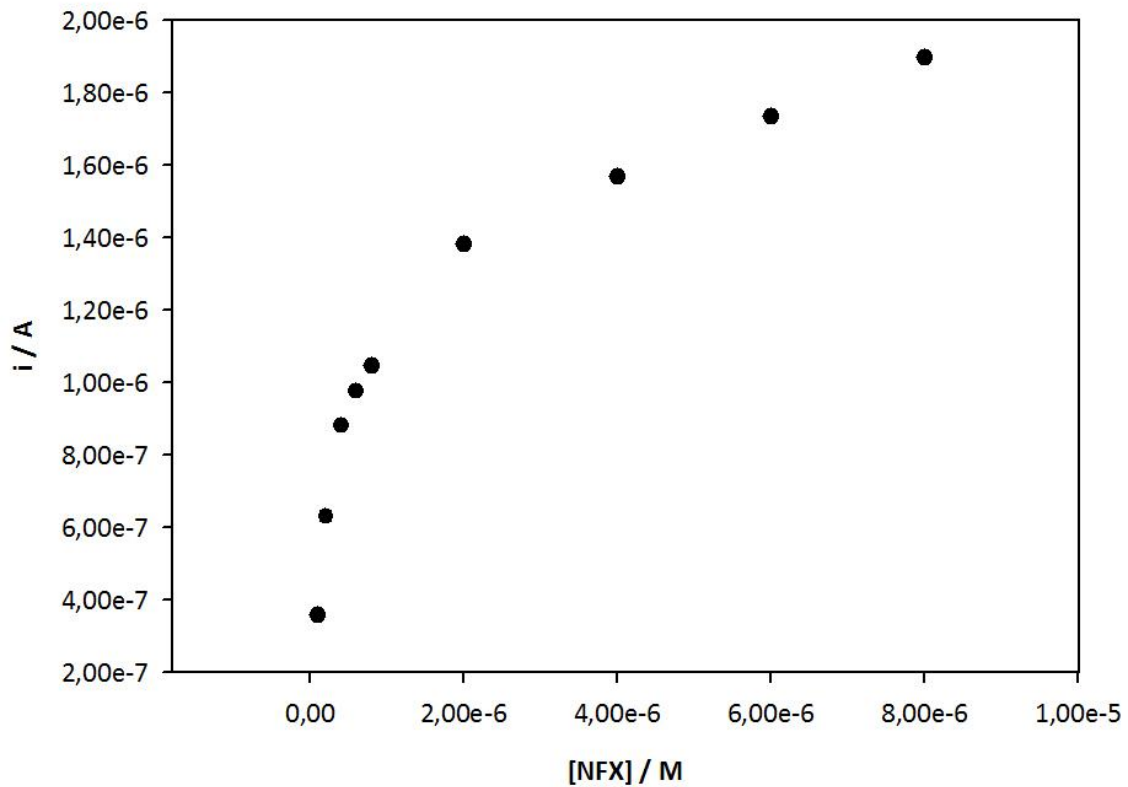


Figura 3.11– Representação da intensidade do pico em função da concentração de NFX nas condições de análise otimizadas

Como se pode verificar na figura não há uma relação linear entra a intensidade de corrente do pico e a concentração de NFX para a gama de concentrações estudadas. No entanto pela tendência demonstrada parece haver uma relação logarítmica. Deste modo construiu-se uma nova curva de calibração em que a intensidade de corrente foi representada em função do logaritmo da concentração de NFX (Figura 3.12).

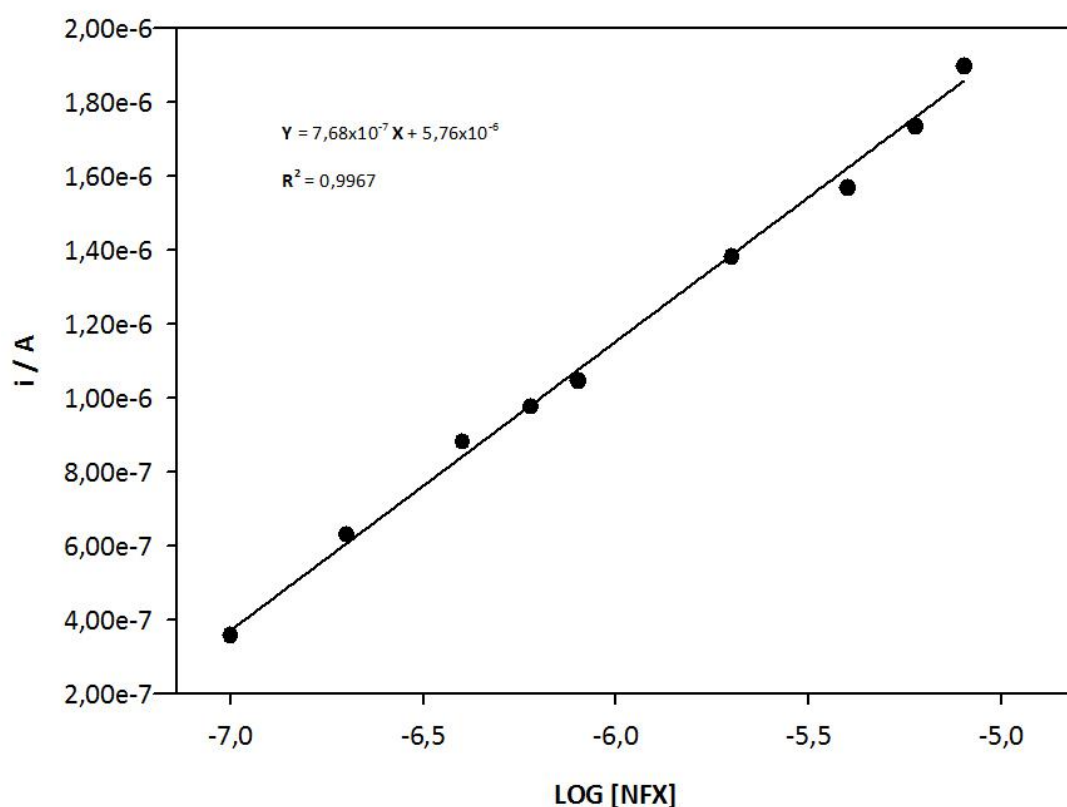


Figura 3.12– Representação da curva de calibração logarítmica nas condições de análise otimizadas

Verifica-se claramente um ajuste linear com um coeficiente de determinação de 0,9967. A partir desta curva de calibração estimou-se um limite de detecção de 0,2 μM .

3.4.2 Repetibilidade

A precisão do sensor foi inicialmente avaliada através de ensaios de repetibilidade. Foram preparados 2 sensores. Para cada sensor foram realizadas 4 ou 5 determinações no mesmo dia, usando incubações em solução de NFX de 1mM. Os voltamogramas obtidos para a detecção da NFX com cada um dos sensores estão representados na Figura 3.13.

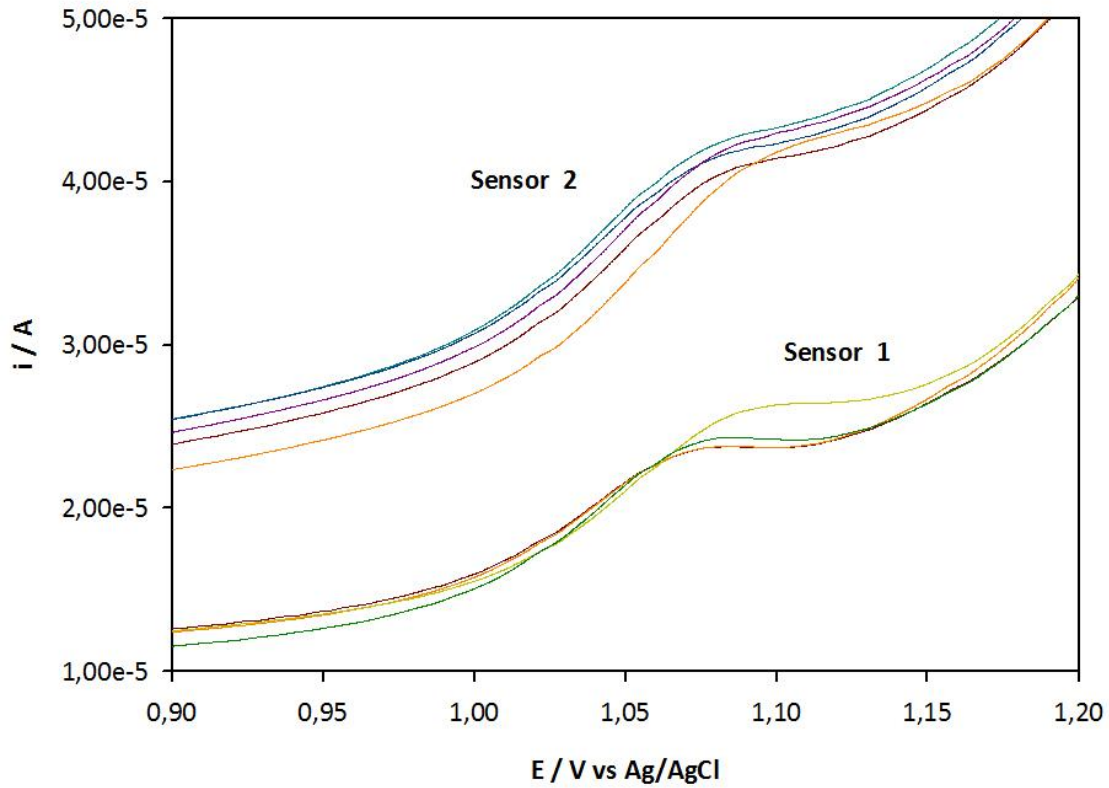


Figura 3.13– Voltamogramas relativos aos ensaios de repetibilidade realizados com 2 sensores.

Na tabela 3.1 estão representados os dados obtidos num mesmo dia, tendo-se calculado para cada um dos sensores o valor do coeficiente de variação em percentagem. Este valor foi usado como indicador da repetibilidade.

Tabela 3.1— Ensaios de repetibilidade

Repetibilidade – Intraday			
Sensor 1		Sensor 2	
	8,82E-06		9,20E-06
	9,04E-06		1,01E-05
	9,75E-06		9,69E-06
	8,45E-06		9,55E-06
			1,03E-05
MEDIA	9,02E-06	MEDIA	9,76E-06
DESVIO	0,548E-06	DESVIO	0,434E-06
COEF VAR	6,1 %	COEF VAR	4,5 %

Existem algumas diferenças nos resultados obtidos entre os sensores. Isto pode ser justificado com o fato de os elétrodos de trabalho usados não serem novos. Ao fim de muito tempo de utilização podem estar a apresentar respostas ligeiramente diferentes, sobretudo devido às suas superfícies terem sofrido diferentes desgastes. Contudo obteve-se valores de CV de 6,1 e 4,5% que podem ser considerados valores satisfatórios para este tipo de sensor.

3.4.3 Reprodutibilidade

Avaliou-se ainda a reprodutibilidade da construção do sensor, de modo a verificar se sensores construídos em dias diferentes apresentariam respostas idênticas. Para isso procedeu-se a incubações em soluções de 1mM de NFX em 10 dias diferentes com sensores preparados diariamente. Os resultados obtidos encontram-se expressos na tabela 3.2.

Tabela 3.2— Ensaio de reprodutibilidade

Reprodutibilidade – Interday	
Dia 1 -	1,14E-05
Dia 2 -	1,10E-05
Dia 3 -	1,39E-05
Dia 4 -	1,33E-05
Dia 5 -	1,13E-05
Dia 6 -	1,30E-05
Dia 7 -	1,15E-05
Dia 8 -	1,40E-05
Dia 9 -	1,26E-05
Dia 10 -	1,14E-05
MEDIA	1,23E-05
DESVIO	0,11421E-05
COEF VAR	9,3

Foi calculado um coeficiente de variância de 9,3% para estes ensaios. Pode afirmar-se que é um valor bastante satisfatório para a reprodutibilidade da construção do sensor.

3.5 Aplicação em Amostras Reais

A parte final do trabalho consistiu na aplicação do sensor na deteção de NFX em amostras reais de urina, água da torneira pública e do rio Lima. Pretendeu-se essencialmente

validar a aplicação em amostras complexas como é o caso da urina. A aplicação em amostras de água surge como um complemento, visto serem amostras com menor complexidade.

3.5.1 Aplicação em Amostras de Urina

Uma característica essencial num sensor molecularmente impresso é a seletividade. Ao longo do trabalho foi possível provar a existência de cavidades no polímero do sensor, com capacidade para efetuar a ligação com a NFX. Contudo, importa mostrar que essas cavidades são seletivas, ou seja permitem uma interação apenas com as moléculas de NFX discriminando todas as outras presentes na amostra (interferentes).

Partindo da urina como um meio complexo, foram selecionados três interferentes que aparecem em grandes quantidades nesta amostra, para a realização dos estudos de seletividade: Ureia, ácido ascórbico e glucose.

Para a realização do estudo prepararam-se soluções contendo 0,1mM de NFX e 1mM do respetivo interferente e analisou-se a resposta do sensor NFX de acordo com as condições descritas anteriormente. Com isto pretendeu-se avaliar a resposta do sensor de NFX na presença de interferentes com uma concentração dez vezes maior. A resposta do sensor na presença de cada interferente foi comparada com a resposta normal sem interferentes e os resultados foram expressos como % de recuperação de NFX (Figura 3.14).

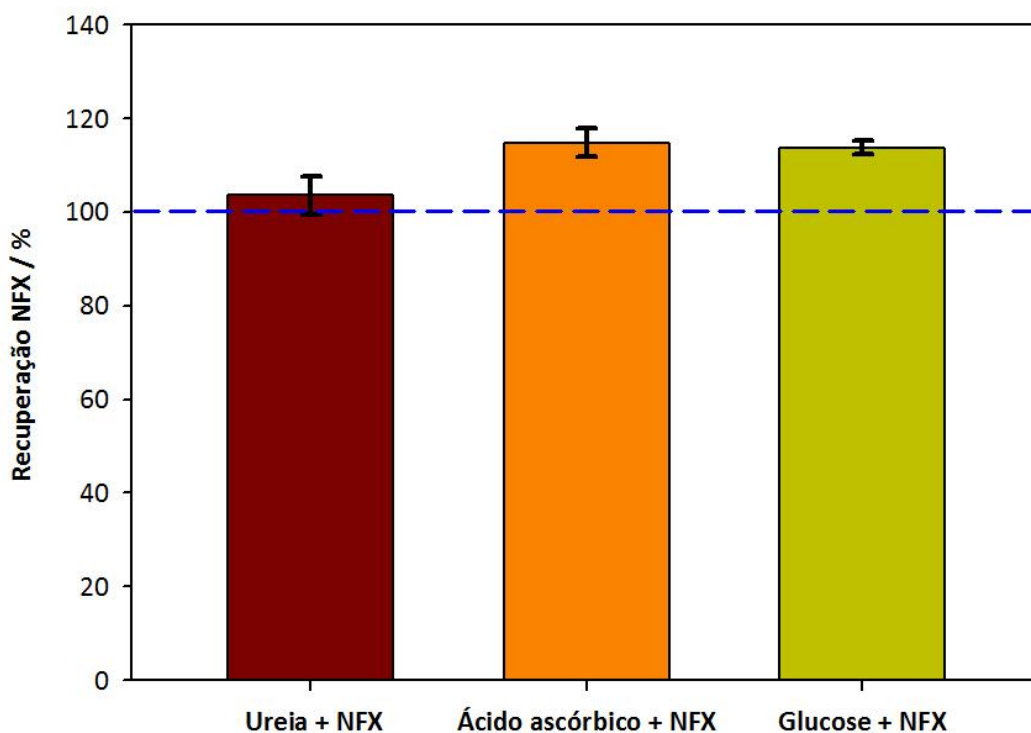


Figura 3.14– Gráfico da variação % de recuperação de uma solução de NFX 1mM em função da presença de interferentes com uma concentração 10 vezes superior.

Os resultados obtidos permitem verificar que há ligeiras diferenças na resposta do sensor na deteção de NFX. Por um lado, verifica-se que não há uma diminuição do sinal, fato que permite concluir que os interferentes estudados não bloqueiam as cavidades e que estas podem ser preenchidas pela NFX. Caso as cavidades fossem obstruídas, um menor número de moléculas de NFX poderiam ligar-se ao polímero e como tal a resposta analítica seria menor. Para a ureia verifica-se que não há praticamente alteração da resposta. Para os outros dois interferentes observou-se um ligeiro aumento do sinal. O potencial de oxidação destes dois interferentes é bem inferior ao potencial de oxidação da NFX, pelo que este aumento não poderá ser atribuído à oxidação destas moléculas. Provavelmente a presença destas moléculas durante a incubação pode alterar favoravelmente os equilíbrios de ligação NFX com o polímero.

É importante referir que, os interferentes encontram-se numa concentração muito elevada (dez vezes superior ao da NFX). Para concentrações mais baixas é possível que estas diferenças de sinal sejam diminuídas. Estes resultados permitem afirmar que o sensor é seletivo

na presença destas moléculas. O pequeno aumento de sinal pode facilmente ser ultrapassado por correções do efeito de matriz (diluição da amostra ou utilização do método das adições padrão).

Posteriormente aplicou-se o sensor na detecção da NFX numa amostra de urina. A urina foi previamente centrifugada de modo a remover proteínas que, pelo peso molecular elevado podem bloquear o acesso das moléculas de NFX na superfície do sensor. Normalmente, as concentrações de NFX que aparecem na urina dos pacientes que tomam o fármaco são muito elevadas (acima de 0,1mM). O sensor desenvolvido apresenta uma gama de linearidade bem abaixo deste valor. Deste modo optou-se por diluir as amostras de urina, reduzindo-se efeitos de matriz. A solução de incubação foi obtida a partir de 10% de urina e 90% de solvente de incubação (água/acetonitrilo com ácido sulfúrico).

Procedeu-se à incubação em amostras de urina (sem fármaco) e em urina dopada previamente com 0,1mM de NFX nas condições otimizadas anteriormente. Na figura 3.15 estão representados os resultados obtidos.

Verifica-se que para a amostra de urina não dopada não se verifica nenhum pico na zona de oxidação da NFX, como seria de esperar. Na amostra dopada é possível verificar o aparecimento do pico correspondente à NFX, fato que comprova a aplicabilidade do sensor nesta amostra. Mostrou-se claramente que foi possível incubar e detetar a NFX na urina. Após a realização de 3 ensaios consecutivos estimou-se uma percentagem de recuperação de 107% com desvio padrão de 1,5%.

Além disso, é possível observar um outro pico nesta amostra com um potencial de oxidação de cerca de +0,45 V, que pode estar relacionado com algum composto que também é adsorvido à superfície do polímero. Os resultados mostram que este pico não interfere com a análise da NFX. Além disso verifica-se que este pico é maior quando não há NFX e diminui na presença da NFX. Isto permite concluir que mesmo sendo adsorvido há uma discriminação positiva para a NFX.

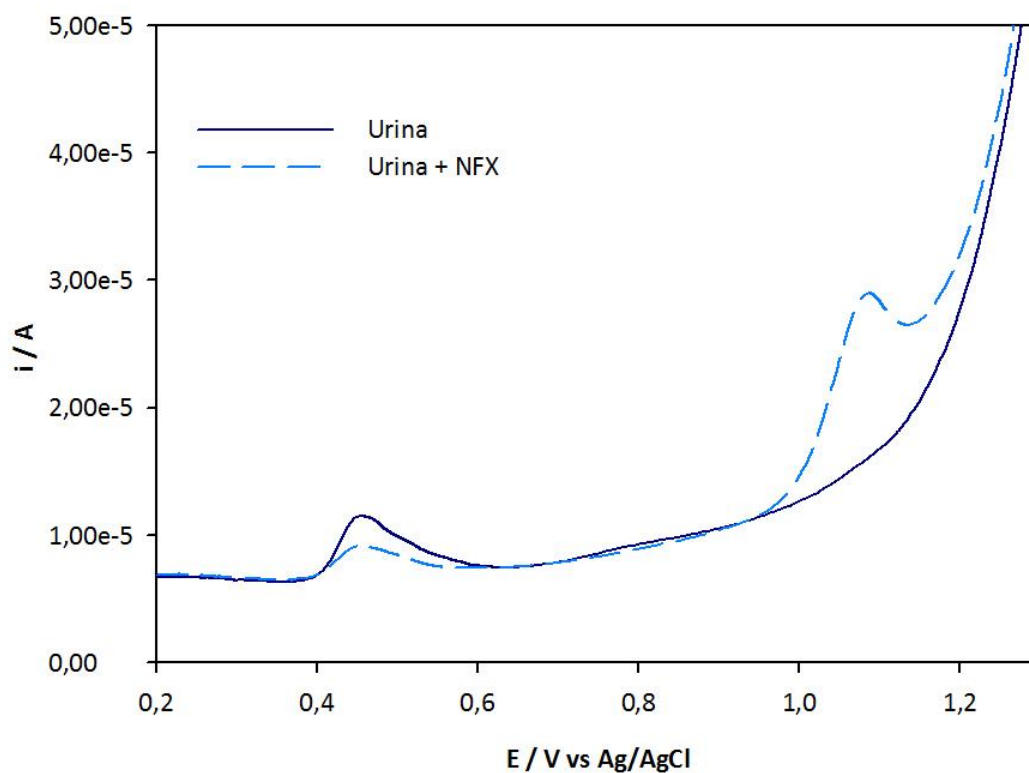


Figura 3.15– Voltamogramas relativos à aplicação do sensor na detecção da NFX numa amostra de urina.

3.5.2 Aplicação em Amostras de Água

Por fim testou-se ainda a detecção da NFX em duas amostras de água: água da torneira pública e de um rio. As amostras foram diluídas 50% no solvente de incubação e procedeu-se à detecção de acordo com o procedimento otimizado. Cada amostra foi dopada com 10 μM de NFX. Os voltamogramas obtidos estão ilustrados nas figuras 3.16 e 3.17.

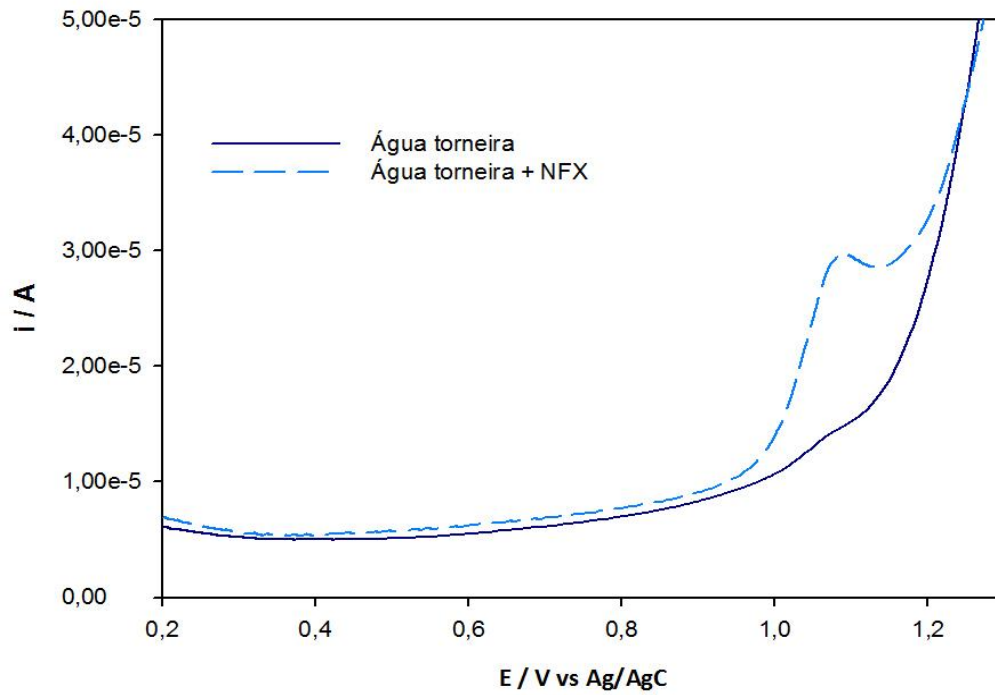


Figura 3.16– Voltamogramas relativos à aplicação do sensor na detecção de NFX numa amostra de água de torneira pública

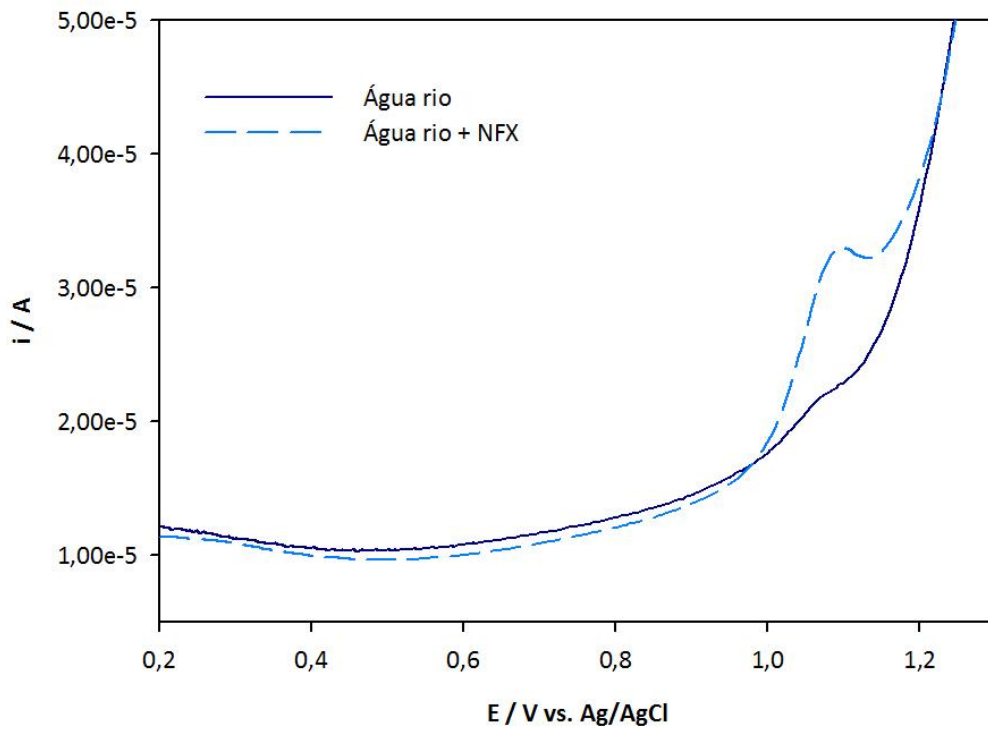


Figura 3.17– Voltamogramas relativos à aplicação do sensor na detecção de NFX numa amostra de água de rio.

Verifica-se a detecção com sucesso nas amostras dopadas. Para a água da torneira obteve-se uma taxa de recuperação de 103% com um desvio padrão de 4%. Para a amostra de água do rio a taxa de recuperação foi de 108% com um desvio padrão de 9%.

Em ambas as amostras foi possível observar-se um pequeno pico nas amostras não dopadas na zona da NFX. Não é possível concluir se este pico corresponde à NFX, sendo que nesse caso as amostras estudadas apresentariam-se contaminadas com este fármaco, ou se pode ser um pico relativo a um interferente desta amostra. Mais estudos teriam que ser realizados de forma a analisar esta situação.

4 Conclusões

Neste estudo foi desenvolvido com sucesso um sensor eletroquímico para a deteção da NFX. A principal característica deste sensor é a seletividade. Tal foi conseguido recorrendo à tecnologia de impressão molecular.

Pode-se concluir que a impressão molecular da NFX num polímero de pirrol formado na superfície de um elétrodo de carbono foi conseguida com êxito. Verificaram-se claras diferenças entre o sensor MIP e o controlo (NIP) na resposta analítica. Os estudos de seletividade permitiram também concluir que o sensor apresenta uma discriminação positiva entre as moléculas de NFX e alguns interferentes. A utilização de um polímero eletroativo como o pirrol, permite a realização de uma polimerização por procedimentos eletroquímicos. Este processo é bastante simples, fácil e rápido. Uma das grandes vantagens é a fácil ligação entre o elemento seletivo (polímero) e a transdução (superfície do elétrodo).

Além da seletividade foi também possível aumentar a intensidade de pico de oxidação da NFX recorrendo ao uso de MWCNT.

Após o estudo e otimização do procedimento de deteção com o sensor desenvolvido aplicou-se a metodologia na deteção da NFX em amostras reais. Sendo possível utilizar o sensor neste tipo de amostras. A performance analítica do método, nomeadamente o limite de deteção permite claramente detetar os fármacos com níveis bastante inferiores aos que aparecem na urina. Este limite é satisfatório para a avaliação em amostra de água.

A metodologia desenvolvida é de fácil utilização e permite uma análise relativamente rápida. O procedimento de preparação do sensor é de baixo custo e reprodutível. A principal desvantagem da utilização do sensor está relacionada com a necessidade de extração do fármaco após cada análise. Este é o fator limitante em termos e tempo. O sensor apresenta potencial para miniaturização e aplicação em análises de rotina. Neste caso pode ser desenvolvido sob a forma de eletrodo descartável, modificado por exemplo, “screen printed electrodes” dado o baixo custo que apresentam. Deste modo não seria necessário o procedimento de extração. Cada eletrodo seria usado apenas uma vez. Assim podia ser comercializado um sensor robusto, seletivo e sensível para a detecção da NFX de uso bastante simples.

Referências

- [1] “Ciclo de vida de um medicamento,” Infarmed, Agosto 2008. [Online]. Available: www.infarmed.pt. [Acedido em 10 Abril 2013].
- [2] D. Pereira, “Importância do metabolismo no planejamento de fármacos,” *Química Nova*, vol. 30, n.º 1, 2006.
- [3] L. L. Bruton, B. A. Chabner e B. C. Knollmann, *Goodman&Gilman’s pharmacological basis of therapeutics*, New York: McGraw-Hill, 2011.
- [4] P. Olavi e A. Joma, “Pharmacology - Pharmacokinetics: How does the body handle drugs?,” vol. 1.
- [5] A. Oliveira, C. Pedroso, M. Mirilis, D. Montruchio, S. Zanin e D. Domeles, “Pharmaceutical Assistance in antibiotics therapy,” *Visão Acadêmica*, vol. 5, pp. 7-14, 2004.
- [6] J. Davies e D. Davies, “Origins and Evolution of Antibiotic Resistance,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, n.º copyright, pp. 417-433, 2010.
- [7] D. Oliveira, L. Momesso e M. Pupo, “Antibiótico: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes,” *Química Nova*, vol. 33, pp. 667-679, 2010.
- [8] T. J. Dougherty e M. J. Pucci, *Antibiotic Discovery and Development*, USA: Springer Science+Business Media, 2012.
- [9] C. Walsh, *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, Washington: ASM Press, 2003.
- [10] K.-J. Huang, X. Liu e W.-Z. Y. H.-X. Xie, “Electrochemical Behavior of Norfloxacin and Its Determination at Poly (methyl red) Film Coated Glassy Carbon Electrode,” *Elsevier*,

vol. 29, pp. 269-274, 2008.

- [11] R. Abd-Elgawad, "Application of Electrochemical Methods for Analysis of Fluoroquinolones Antibacterial Agents and Fluoroquinolones - DNA Interactions," *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*, vol. 3, pp. 27-36, 2010.
- [12] V. Patrícia, *Estudos de síntese e transformação de novos derivados de 4 - quinolona*, Aveiro, 2010.
- [13] R. N. Goyal, A. R. S. Rana e H. Chasta, "Electrochemical sensor for the sensitive determination of norfloxacin in human urine and pharmaceuticals," *Bioelectrochemistry*, vol. 83, pp. 46-51, 2012.
- [14] K.-J. Huang, X. Liu, W.-Z. Xie e H.-X. Yuan, "Electrochemical Behavior of Norfloxacin and Its Determination at Poly (methyl red) Film Coated Glassy Carbon Electrode," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 29, pp. 988-992, 2008.
- [15] P. XueHui, G. WenJuan, W. Li, X. JianDong e H. BaoRong, "Electrochemical, quantum chemical and SEM investigation of the inhibiting effect and mechanism of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin on the corrosion for mild steel in hydrochloric acid," *Springer*, vol. 51, pp. 928-936, 2008.
- [16] Y. Ni, Y. Wang e S. Kokot, "Multicomponent kinetic spectrophotometric determination of pefloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations and human plasma samples with the aid of chemometrics," *Spectrochimica Acta Parte A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 70, pp. 1049-1059, 2008.
- [17] C. Tong e G. Xiang, "Sensitive Determination of Norfloxacin by the Fluorescence Probe of Terbium (III) - Sodium Dodecylbenzene Sulfonate and Its Luminescence Mechanism," *Journal of Fluorescence*, vol. 16, pp. 831-837, 2006.
- [18] R. Goyal, A. Rana e H. Chasta, "Electrochemical sensor for the sensitive determination of norfloxacin in human urine and pharmaceuticals.," *Bioelectrochemistry*, vol. 83, pp. 46-51, 2012.
- [19] "HPLC determination of enoxacin, ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin with photoinduced fluorimetric (PIF) detection and multiemission scanning: Application to urine and serum," *Journal of Chromatography B*, vol. 822, pp. 185-193, 2005.
- [20] C. Kowalski e e. al., "Determination of Norfloxacin in Chicken Tissues by HPLC with Fluorescence Detection," *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 28, pp. 121-135, 2005.
- [21] G. H. Wan e e. al., "Determination of quinolones residues in prawn using high-performance liquid chromatography with Ce(IV)-Ru(bpy)₃²⁺-HNO₃ chemiluminescence detection," *Journal of Chromatography B*, Vols. 1, p. 843, 2006.

- [22] M. G. Trevian e R. J. Poppi, "Química Analítica de processos," *Química Nova*, vol. 29, pp. 1065-1071, 2006.
- [23] S. W. Jon, *Sensor Technology Handbook*, Oxford: Elsevier, 2005.
- [24] D. Lowinsohn e M. Bertotti, "Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos," *Química Nova*, vol. 29, pp. 1318-1325, 2006.
- [25] M. A. B. Christopher, "Electrochemical sensors for environmental monitoring," *IUPAC*, vol. 73, pp. 1969-1977, 2001.
- [26] E. Turiel e A. Martín-Esteban, "Molecularly imprinted polymers for sample preparation," *Elsevier*, pp. 87-99, 2010.
- [27] G. Vasapollo, R. Del Sole, L. Mergola, M. R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano e G. Mele, "Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective Sciences," *International Journal of Molecular*, vol. 12, pp. 5908-5945, 2011.
- [28] C. R. T. Tarley, M. D. P. T. Sotomayor e L. T. Kubota, "Polímeros Biométricos em Química Analítica. Parte 2 Aplicações de MIP("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos," *Química Nova*, vol. 28, pp. 1087-1101, 2005.
- [29] M. Blanco-López, M. Lobo-Castañón, A. Miranda-Ordieres e P. Tuñón-Blanco, "Voltammetric sensor for vanillylmandelic acid based on molecularly imprinted polymer - modified electrodes," *Elsevier*, vol. 18, pp. 353-362, 2002.
- [30] J. Wang, *Analytical electrochemistry*, New York: Wiley - VCH, 2000.
- [31] K. P. e H. W., *Cyclic Voltammetry*, J. Chem. Educ., 1983.
- [32] P. R. Troyk, Z. Hu e S. Cogan, "Comprehensive Cyclic Voltametry Characterization of AIROF Microelectrodes," em *Proceedings of EMBS conference*, China, 2005.
- [33] S. P. Kounaves, *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry - Voltammetric Techniques*, New Jersey: Frank A. Settle, 1997.
- [34] L. M. Aleixo, *Voltametria: Conceitos e Técnicas*, Campinas.
- [35] S. D. A., W. D.M. e H. J.F., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Philadelphia: Saunders College Publishing, 1992.
- [36] R. Greef, R. Peat, L. Peter, D. Fletcher e J. Robinson, *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Chischester: Ellis Horwood Limited, 1985.
- [37] E. Gonçalves, M. Rezende, M. Baldan e N. Ferreira, "Efeito do tratamento térmico na microestrutura, tubostraticidade e superfície de carbono vitreo reticulado analisado por

- XPS, espalhamento raman e voltametria cíclica,” *Química Nova*, vol. 32, pp. 158-164, 2009.
- [38] U. Lange, N. V. Roznyatovskaya e V. M. Mirsky, “Conducting polymers in chemical sensors and arrays,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 614, pp. 1-26, 2008.
- [39] “Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing,” *Analytical and bioanalytical Chemistry*, vol. 402, pp. 3177-3204, 2012.
- [40] “Electrochemical sensors based on conducting polymer-polypyrrole,” *Electrochimica Acta*, vol. 51, pp. 6025-6037, 2006.
- [41] B. Jolicoeur, C. Chapman, A. Thompson e W. Lubell, “Pyrrole protection,” *Elsevier*, vol. 62, pp. 11531-11563, 2006.
- [42] S. Paul, *Polypyrrole*, Canadá: Defence R&D Canadá - Atlantic, 2005.
- [43] A. Jaramillo, L. Spurlock, V. Young e A. Brajter-Toth, “XPS characterization of nanosized overoxidized polypyrrole films on graphite electrodes,” *The analyst*, vol. 124, pp. 1215-1221, 1999.
- [44] Â. G. d. S. Filho e S. B. Fagan, “Funcionalização de nanotubos de carbono,” *Química Nova*, vol. 30, pp. 1695-1703, 2007.
- [45] M. Zheng, A. Jagota, E. Semke, B. Diner, R. Mclean, S. Lustig, S. Richardson e N. Tassi, *Nat. Mater*, 2003.
- [46] M. H. Herbst, M. I. F. Macêdo e A. M. Rocco, “Tecnologia dos nanotubos de carbono: Tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar,” *Química Nova*, vol. 27, pp. 986-992, 2004.
- [47] B. Ray, Z. Anvar e A. d. H. Walt, “Carbon Nanotubes - The route Toward Applications,” *Science*, vol. 297, pp. 787-792, 2002.

