

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Deteção eletroquímica da norfloxacin
e trimetoprim em amostras de urina
utilizando polímero molecularmente
impresso modificado e grafeno

Hélder Filipe Faria da Silva

helder_ffs@sapo.pt

Tese de Mestrado
Outubro de 2012

Orientador(es) no ISEP
Professora Doutora Cristina Delerue-Matos
Doutor Subramanian Viswanathan

Mestrado em
Computação e Instrumentação Médica
Departamento de Física – ISEP

Instituto Superior de Engenharia do Porto
Porto, Portugal

*A Deus, à família, aos amigos, aos colegas de trabalho e orientadores.
Pelo amor, pelo apoio, pelo força, pelo incentivo, pelo companheirismo e pela amizade.*

Agradecimentos

- À Professora Doutora Cristina por me ter acolhido no seu laboratório, pela disponibilidade dispensada, pelo apoio prestado, pela compreensão, incentivo e amizade o meu sincero obrigado.
- To Dr. Viswanathan, for the long hours that spend with me and for the thoughts that transfer during this project. Thanks very much! Without you nothing of this was possible. To meet you was a big pleasure!
- Ao Professor Carlos Ramos pela sua direção no mestrado, pela sua atenção, pela sua preocupação e pela sua ajuda.
- Aos meus colegas de laboratório, pelo carinho, pela paciência, pelas indicações e pelo apoio que demonstraram.
- Aos meus amigos do coração, que me apoiam incondicionalmente e que se enchem de orgulho pela concretização deste trabalho.
- Por fim, ao meus pais, à minha irmã, ao meu Martim, que são o suporte para que tenha concluído mais uma etapa. Obrigado pelo acreditar.

Resumo

A norfloxacin e o trimetoprim são dois antibióticos antibacterianos usados para o tratamento de infecções urinárias, intestinais e respiratórias. A maioria dos fármacos exige uma dosagem que garanta os níveis de segurança e eficácia de atuação. A necessidade de dosear os medicamentos e os seus metabolitos é assim um controlo imperioso e em muitos casos regular no tratamento de um paciente.

Neste trabalho desenvolveram-se dois sensores eletroquímicos para a deteção da norfloxacin (NFX) e do trimetoprim (TMP), usando como superfície de suporte o carbono vítreo. A busca de novos materiais que conferiram maior seletividade e sensibilidade aos sistemas de deteção e por outro lado apresentem menores riscos para o paciente quando usados em dispositivos que permitam uma análise point-of-care, é especialmente importante e pode ser uma parte crucial do processo de decisão clínica. Assim, os polímeros molecularmente impresos enquadram-se nesse perfil e o seu uso tem vindo a ser cada vez mais avaliado. A impressão molecular é uma tecnologia capaz de produzir polímeros que incorporam as moléculas do analito e que após remoção por solventes específicos, permitem dotá-los de locais específicos de reconhecimento estereoquímico. A seleção do pirrol como polímero molecularmente impresso (MIP) permitiu construir com sucesso os sensores para doseamento dos antibióticos. A fim de aumentar a sensibilidade do método incorporou-se grafeno na superfície do elétrodo. Este material tem vindo a ser largamente utilizado devido às suas propriedades: estrutura molecular, condutividade elétrica e aumento da superfície são algumas das características que mais despertam o interesse para a sua aplicação neste projeto.

Os sensores desenvolvidos foram incorporados em sistemas eletroquímicos. Os métodos voltamétricos aplicados foram a voltametria cíclica, a voltametria de onda quadrada e ainda a impedância. As condições de análise foram otimizadas no que respeita à polimerização do pirrol (concentração do polímero, número de ciclos de eletropolimerização e respetivos potenciais aplicados, tempo de incubação, solvente de remoção do analito), ao pH da solução do fármaco, à gama de concentrações dos antibióticos e aos parâmetros voltamétricos dos métodos

de análise. Para cada um dos antibióticos um eletrodo não-impreso foi também preparado, usando o procedimento de polimerização mas sem a presença da molécula do analito, e foi usado como controle.

O sensor desenvolvido para o trimetoprim foi usado no doseamento do fármaco em amostras de urina. As amostras foram analisadas sem qualquer diluição, apenas foram centrifugadas para remoção de proteínas e algum interferente. Os sensores construídos apresentaram comportamento linear na gama de concentrações entre 10^{-2} e 10^{-7} mol/L. Os resultados mostram boa precisão (desvios padrão inferiores a 11%) e os limites de detecção foram de $8,31^{-7}$ e $1,30^{-7}$ mol/L para a norfloxacin e o trimetoprim, respetivamente. Para validação do método foram ainda efetuados ensaios de recuperação tendo obtido valores superiores a 94%.

Palavras-Chave: Trimetoprim, Norfloxacin, Eletroquímica, Polímero Molecularmente Impreso, Grafeno.

Abstract

The Norfloxacin and timethoprim are two antibacterial antibiotics used for treatment of urinary, intestinal and respiratory infections. The most of drugs require a dosage to ensure safety and effectiveness levels of the performance. The necessity to dose drugs and their metabolites is thus a imperative control and in many instances in the treatment of a patient. In this case study we developed two electrochemicals sensors to detect norfloxacin and timethoprim, using as support surface a glassy carbon. The search of the new materials that conferred great selectivity and sensibility to detection systems as well as less risks to the patient when used in devices that allow analysis point-of-care, is specially important and can be a crucial part of clinical decision process. Thus, polymers that came of molecularly imprinted fits into this profile and their use has been increasingly evaluated.

The molecular imprinting is a technology capable to produce polymers that incorporate molecules of analyte and after remotion by specific solvents, allow endow them of specific places of stereochemical recognition. The selection of pyrrol as molecularly imprinting polymer (MIP) enable to build with success sensors to dosing antibiotics. To increase the method sensibility, embodied Graphene on electrode surface. This material have been widely used because of their properties: molecular structure, electric conductivity and surface increased are some characteristics that arouse interest to application in this project.

Developped sensors were incorporated in electrochemical systems. Voltammetric methods applied were cyclic voltammetry, square wave voltammetry and impedance. The analysis conditions were optimized as regards the pyrrol polymerization (polymer concentration, number of cycles of electropolymerization and respective potentials applied, incubation time, solvent for analyte remotion), pH of drug solution, concentration range of antibiotics and voltammetric parameters of analyse methods. For each of one antibiotics, a non-imprinted electrode was prepared using a polymerization process but without the presence of analytic molecule, and was used as control.

The developed sensor to trimethoprim was used in dosage of drug in urine samples. The samples were analysed without any dilution, just were centrifuged to remove proteins and some interferents. The built sensors present a linear behaviour with concentrations range between 10^{-2} and 10^{-7} mol/L. The results show a good precision (standard deviation below a 11%) and the detection limits were $8,31 \cdot 10^{-7}$ and $1,30 \cdot 10^{-7}$ mol/L, to norfloxacin and trimethoprim, respectively. To method validation were made recuperation assays have been get values above 94%.

Key-Words: Trimethoprim, Norfloxacin, Electrochemical, Molecularly Imprinting Polymer, Graphene.

Sommaire

La norfloxacine et le triméthoprim sont deux antibiotiques anti bactériens utilisés dans le traitement d'infections des voies urinaires, intestinales et respiratoires. La majorité des produits pharmaceutiques exige une posologie qui veille à ce que les niveaux de sécurité et d'efficacité soient sûrs. Le besoin de titrer les médicaments et leurs métabolites représente un contrôle obligatoire, et en ce qui concerne beaucoup de cas, régulier dans la thérapeutique utilisée dans le traitement un patient.

Dans ce travail deux capteurs électrochimiques ont été développés afin de faire la détection de la norfloxacine et la triméthoprim en utilisant comme surface de soutien le carbone vitreux. La recherche de nouveaux matériaux qui ont donné une plus grande sélectivité et la sensibilité des systèmes de détection et d'autre part, ils ont moins de risques pour le patient lorsqu'il est utilisé dans des dispositifs qui permettent une analyse point-of-care. Elle est particulièrement importante et peut être un élément essentiel du processus décisionnel clinique. Ainsi, les polymère à empreinte moléculaire correspondent à ce profil, et son utilisation a été évaluée de plus en plus. L'empreinte moléculaire est une technologie capable de produire des polymères incorporant les molécules d'analyte et qui après l'extraction par des solvants spécifiques, permettent de leur fournir des lieux spécifiques de reconnaissance électrochimique. La sélection de l'empreinte moléculaire polymère comme le pyrrole (MIP) a réussi à construire des capteurs pour la détermination des antibiotiques.

Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, le graphène a été incorporé à la surface de l'électrode. Ce matériel a été largement utilisé en raison de ses propriétés : structure moléculaire, la conductivité électrique et l'accroissement de la surface sont quelques-unes des caractéristiques que suscite l'intérêt de la plupart pour la mise en travaille de ce projet. Les capteurs mis au point ont été intégrés dans les systèmes électrochimiques. Les méthodes volt ampérométriques appliquées ont été la voltampérométrie cyclique, la voltamétrie à onde carrée et l'impédance. Des conditions d'analyse ont été optimisées en ce qui concerne la

polymérisation du pyrrole (concentration de polymère, nombre de cycles d'électro polymérisation et de leur potentiel appliqué, temps d'incubation, enlèvement de l'analyte de solvant), le pH de la solution du médicament, la gamme de concentrations d'antibiotiques et les paramètres volt ampérométriques de méthodes d'analyse. Pour chacun des antibiotiques une électrode non imprimée a été aussi préparée, à l'aide de la procédure de traitement, mais sans la présence de la molécule de la substance à analyser et a été utilisé comme repère. Le capteur mis au point pour le triméthoprime est utilisé dans la détermination du médicament dans les échantillons d'urine. Les échantillons ont été analysés sans aucune dilution juste pour enlèvement de protéine et certaines interférences. Les capteurs construits présentent un comportement linéaire dans la gamme de concentrations entre 10^{-2} et 10^{-7} mol/L. Les résultats montrent la bonne précision (écart-type inférieur à 11%) et les limites de détection étaient de $8,31 \cdot 10^{-7}$ et $1,30 \cdot 10^{-7}$ mol/L à la norfloxacin et triméthoprime, respectivement. Pour la validation de la méthode des essais ont été également réalisés obtenant des valeurs de récupération supérieures à 94%.

Mots clés : Triméthoprime, Norfloxacin, Electrochimie, Empreinte Moléculaire de Polymère, Graphène.

Conteúdo

| | |
|--|------|
| Resumo | ix |
| Abstract | xi |
| Sommaire | xiii |
| Índice | xiv |
| Lista de Figuras | xvi |
| Lista de Tabelas | xvii |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Ciclo Geral dos Medicamentos | 1 |
| 1.2 Antibióticos | 2 |
| 1.2.1 Norfloxacin | 2 |
| 1.2.2 Trimetoprim | 4 |
| 1.3 Métodos de detecção da Norfloxacin e Trimetoprim | 5 |
| 1.3.1 Necessidade de detecção de fármacos | 5 |
| 1.3.2 Estudos de detecção da Norfloxacin | 6 |
| 1.3.3 Estudos de detecção do TMP | 7 |
| 1.3.4 Vantagens da detecção eletroquímica sobre outros métodos | 8 |
| 1.4 Sensores | 8 |
| 1.4.1 Sistemas de Reconhecimento | 10 |
| 1.4.2 Sistemas de Transdução | 10 |
| 1.4.3 Sistemas de Eletroquímicos | 10 |
| 1.5 Técnicas Eletroquímicas | 11 |
| 1.5.1 Princípios de Electroquímica | 11 |
| 1.5.2 Voltametria | 12 |
| 1.5.3 Impedância | 16 |
| 1.6 Sistema Voltamétrico | 18 |
| 1.6.1 Eléctrodo de Carbono Vítreo | 19 |
| 1.7 Eléctrodos Modificados | 20 |
| 1.7.1 Polímero Molecularmente Impresso | 20 |
| 1.7.2 Pirrol utilizado na construção de MIPs | 23 |
| 1.7.3 Nanomateriais | 24 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1.7.4 | Grafeno | 26 |
| 1.8 | Organização da dissertação | 28 |
| 2. | Parte Experimental | 33 |
| 2.1 | Reagentes e Soluções | 33 |
| 2.2 | Equipamento | 34 |
| 2.3 | Procedimentos | 35 |
| 2.3.1 | Limpeza de Eléttodos | 35 |
| 2.3.2 | Síntese de Grafeno | 36 |
| 2.3.3 | Preparação de Polímero Molecularmente Impresso para Trime- toprim - MIP | 36 |
| 2.3.4 | Preparação de Polímero Não Molecularmente Impresso para TMP - NIP | 37 |
| 2.3.5 | Preparação de Sobreoxidação para MIP e NIP da TMP | 38 |
| 2.3.6 | Metodo Direto para Detecção de TMP | 38 |
| 2.3.7 | Preparação de Polímero Molecularmente Impresso para NFX - MIP | 40 |
| 2.3.8 | Preparação de Polímero Não Molecularmente Impresso para NFX - NIP | 41 |
| 2.3.9 | Preparação de sobreoxidação para MIP e NIP da NFX | 41 |
| 2.3.10 | Metodo Indireto para Detecção de NFX | 41 |
| 3. | Resultados e Discussão | 43 |
| 3.1 | Pré-tratamento dos eléttodos | 43 |
| 3.2 | Eliminação de oxigénio da solução por aplicação de azoto | 44 |
| 3.3 | Grafeno | 44 |
| 3.4 | Trimetoprim | 45 |
| 3.4.1 | Preparação do MIP para o Trimetoprim | 45 |
| 3.4.2 | Sobreoxidação do MIP e NIP | 47 |
| 3.4.3 | Aplicação de Grafeno | 48 |
| 3.4.4 | Detecção de Trimetoprim | 49 |
| 3.4.5 | Curva de calibração do Trimetoprim | 50 |
| 3.4.6 | Doseamento de TMP em amostras de urina | 52 |
| 3.5 | Norfloxacina | 53 |
| 3.5.1 | Preparação do MIP para a Norfloxacina | 53 |
| 3.5.2 | Sobreoxidação do MIP e NIP | 54 |
| 3.5.3 | Detecção de NFX por voltametria cíclica | 55 |
| 3.5.4 | Detecção de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ por onda quadrada para deter- minação da NFX | 55 |
| 3.5.5 | Curva de calibração da Norfloxacina | 56 |
| 3.5.6 | Estudo de Impedância | 57 |
| 4. | Conclusão | 61 |
| | Bibliografia | 63 |

Lista de Figuras

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Ciclo dos medicamentos do organismo | 2 |
| 1.2 | Estrutura molecular da norfloxacin | 3 |
| 1.3 | Esquema de ação das quinolonas na replicação do DNA | 4 |
| 1.4 | Estrutura molecular do trimetoprim | 4 |
| 1.5 | Estrutura de um sensor | 8 |
| 1.6 | Características importantes para a escolha de um sensor | 9 |
| 1.7 | Esquema dos níveis de Fermi na equação de oxidação redução | 12 |
| 1.8 | Processos de transporte de massa das espécies do seio da solução para a superfície do eletrodo | 13 |
| 1.9 | Sinal de excitação em voltametria cíclica | 14 |
| 1.10 | Voltamograma cíclico típico para um sistema reversível | 15 |
| 1.11 | Forma de onda na voltametria de onda quadrada | 15 |
| 1.12 | Voltamograma esquemático de onda quadrada para um processo de oxidação-redução reversível | 16 |
| 1.13 | Representação de estudo de impedância eletroquímica | 17 |
| 1.14 | Representação esquemática de uma célula eletroquímica com três eletrodos | 18 |
| 1.15 | Estrutura de poros abertos de um eletrodo de carbono vítreo | 20 |
| 1.16 | Gráfico representativo do número cumulativo de publicações sobre MIPs por ano | 21 |
| 1.17 | Esquema de polimerização e de reconhecimento molecular | 22 |
| 1.18 | Estrutura química do pirrol | 23 |
| 1.19 | Diagrama e microscopias dos diferentes tipos dos Nanotubos de Carbono | 25 |
| 1.20 | Membrana de grafeno por Microscopia de Transmissão de elétrons | 27 |
| 1.21 | Processo de oxidação de grafite | 28 |
| 2.1 | Autolab utilizado | 34 |
| 2.2 | Célula eletroquímica contendo os três eletrodos: trabalho, referência e auxiliar | 34 |
| 3.1 | Limpeza de eletrodos de carbono vítreo em solução de H_2SO_4 0,5 mol/L | 44 |
| 3.2 | Interferência do azoto em solução. | 45 |
| 3.3 | Imagens TEM de grafeno sintetizado | 46 |
| 3.4 | Voltamogramas de polimerização correspondentes a: MIP e NIP | 47 |
| 3.5 | Comparação entre a sobreoxidação aplicada ao MIP e NIP | 48 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.6 | Comparação de um MIP com e sem grafeno | 49 |
| 3.7 | Comparação entre a deteção da trimetoprim com MIP e NIP | 50 |
| 3.8 | Voltamogramas obtidos para soluções padrão de TMP de concentrações 0,01 a $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L: (a) MIP com grafeno e (b) MIP sem grafeno | 51 |
| 3.9 | Representação gráfica correspondente aos voltamogramas de TMP, curva de calibração e coeficientes de determinação | 51 |
| 3.10 | Aplicação real: testes de deteção de TMP, em amostra de urina real, a uma concentração de 10^{-4} mol/L | 52 |
| 3.11 | Perfis de Polimerização: MIP e NIP | 53 |
| 3.12 | Comparação entre a overoxidação aplicada ao MIP e NIP | 54 |
| 3.13 | Diferença entre MIP com(a)/sem(b) NFX, pelo método de voltametria cíclica | 55 |
| 3.14 | Diferença entre MIP com/sem NFX, pelo método onda quadrada | 56 |
| 3.15 | Comparação entre os níveis de deteção da NFX | 57 |
| 3.16 | Curva de calibração para a deteção da NFX | 58 |
| 3.17 | Estudo de impedanciometria para a caracterização do MIP da NFX | 59 |

Lista de Tabelas

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | Métodos usados na detecção da Norfloxacin (NFX) | 30 |
| 1.2 | Métodos usados na detecção do Trimetoprim (TMP) | 31 |
| 1.3 | Exemplos de MIPs que utilizaram o pirrol como monómero funcional | 32 |
| 2.1 | Composição da solução usada para a preparação do MIP para TMP | 37 |
| 2.2 | Condições de polimerização para construção do MIP para TMP . . | 37 |
| 2.3 | Composição da solução usada para a preparação do NIP para TMP | 37 |
| 2.4 | Composição da solução eletrolítica e condições usadas na preparação do MIP/NIP para o TMP com sobreoxidação | 38 |
| 2.5 | Composição da solução usada para a preparação do MIP para NFX | 40 |
| 2.6 | Condições da polimerização para construção do MIP para NFX . . | 40 |
| 2.7 | Composição da solução usada para a preparação do NIP da NFX . | 41 |
| 2.8 | Composição da solução eletrolítica e condições usadas na preparação do MIP/NIP para NFX com sobreoxidação | 41 |

Abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| A | Ampere |
| CE | Elétrodo Auxiliar |
| CNT | Nanotubos de Carbono |
| CV | Voltametria Cíclica |
| E | Potencial |
| ECP | Polímero Eletronicamente Condutor |
| GCE | Elétrodo de Carbono Vítreo |
| GO | Óxido de Grafeno |
| LOD | Limite de Detecção |
| LOQ | Limite de Quantificação |
| MIP | Polímero Molecularmente Impresso |
| MIPOPPY | Polipirrole Overoxidado Molecularmente Impresso |
| MIPPY | Polipirrole Molecularmente Impresso |
| NFX | Norfloxacin |
| PPY | Polipirrole |
| RE | Elétrodo de Referência |
| RPM | Rotações por Minuto |
| SWV | Voltametria de Onda Quadrada |
| TMP | Trimetoprim |
| V | Volt |
| WE | Elétrodo de Trabalho |
| Z | Impedância |

Introdução

1.1 Ciclo Geral dos Medicamentos

Para um medicamento atuar, é primordial que consiga atingir as estruturas celulares onde a sua ação se vai exercer. Algumas vezes, o medicamento é colocado diretamente em contacto com essas estruturas como as mucosas ou a pele, aplicação que se designa-se por tópica ou local. Outras vezes, o medicamento tem de chegar à corrente sanguínea para que seja distribuído pelo organismo, tecidos e células onde irá decorrer a sua ação. Para tal, recorre-se a uma aplicação sistémica que engloba uma série de vias diferentes: a endovenosa, que consiste na aplicação direta do fármaco na corrente sanguínea, e as vias oral, inalatória e intramuscular, que apresentam barreiras celulares que têm de ser ultrapassadas através de um fenómeno de absorção. Esta última é essencial para que o fármaco atinja a corrente sanguínea e seja, assim, distribuído pelos diversos tecidos (fase de distribuição).

A maior diferença entre os inúmeros fármacos existentes deve-se aos seus variados mecanismos de ação. Além disso, de acordo com as características estruturais e químicas do fármaco (ex: maior ou menor lipossolubilidade, grau de ionização,...) o processo de distribuição/redistribuição pelos órgãos e tecidos difere largamente entre eles.

Após a molécula ativa atingir o local alvo e exercer a sua ação, ocorrem normalmente mecanismos que visam a sua eliminação. Ou é excretada intacta ou metabolizada (a maior parte das vezes através de reações enzimáticas que a tornam mais hidrossolúvel e permitem a sua eliminação através da urina e suor). No entanto, pode, ao invés, ser convertida num metabolito ativo. Esta fase do metabolismo é conhecida como biotransformação.

O ciclo geral dos medicamentos no organismo (farmacocinética) ocorre de modo dinâmico, com as suas fases a imbricar umas nas outras. Ou seja, en-

quanto vai ocorrendo absorção, algumas frações já foram distribuídas e outras transformadas e/ou eliminadas. Ciclo este apresentado na figura 1.1.

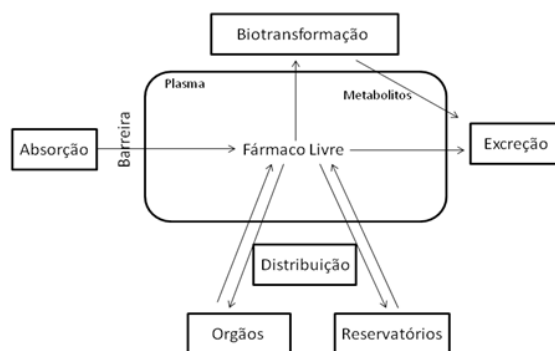


Fig. 1.1: Ciclo dos medicamentos do organismo.

1.2 Antibióticos

O termo "antibiótico" designa toda a substância química, natural ou sintética, que apresenta capacidade para combater infecções provocadas por determinados microrganismos, mais especificamente bactérias. Os antibióticos antibacterianos devem ter um tropismo para a célula bacteriana alvo e, idealmente, não devem apresentar qualquer efeito nefasto sobre o Homem (ou animal) ou mesmo sobre outros microrganismos. Assim, só deverão ser usadas em terapêutica as moléculas que aliam à sua atividade antibacteriana uma baixa toxicidade, isto é, que apresentam um bom índice terapêutico [1].

Neste trabalho de investigação foram utilizados dois antibióticos diferentes: a norfloxacin (da família das quinolonas) e o trimetoprim (uma diaminopirimidina).

1.2.1 Norfloxacin

A norfloxacin (NFX) ou ácido 1-etil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinacarboxílico é um composto químico que pertence à família das quinolonas. A sua estrutura molecular é apresentada na figura 1.2.

As quinolonas são agentes antibacterianos de síntese derivados do ácido nalidíxico. Este foi descoberto no processo de síntese e purificação da cloroquina, possui alguma capacidade antibacteriana, mas apresenta um espectro de ação estreito, sendo normalmente utilizado no tratamento da cistite causada por bactérias Gram negativas. Com vista a melhorar o seu espectro de ação, foram efetuadas ligeiras alterações na sua estrutura molecular.

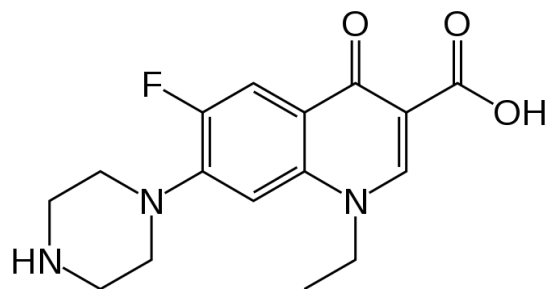


Fig. 1.2: Estrutura molecular da norfloxacin [2].

Atualmente, existem quatro gerações de quinolonas. É na segunda que se insere a norfloxacin. As moléculas pertencentes a esta geração (quinolonas fluoradas ou fluoroquinolonas) possuem um grupo flúor na posição 6 que permitiu uma revolução nesta família farmacológica: espectro de ação mais largo, atividade antibacteriana mais intensa, boa difusão para os tecidos e, por fim, reduzida toxicidade. Mais especificamente, apresentam elevada atividade contra bactérias Gram negativas, contra patogênicos atípicos intracelulares e ação limitada contra bactérias Gram positivas. Daí que a norfloxacin seja utilizada não só para o tratamento de infecções urinárias, mas também de infecções respiratórias, gastrointestinais, da pele e dos tecidos moles. As quinolonas das gerações desenvolvidas posteriormente já apresentam uma ação eficaz contra bactérias Gram positivas, ou seja, possuem um espectro de ação ainda mais amplo.

No que concerne ao seu mecanismo de ação, as quinolonas interferem no mecanismo de replicação e transcrição do ADN (ácido desoxirribonucleico). As moléculas de ADN apresentam uma configuração de dupla hélice enrolada. As quinolonas atuam por inibição da ação das topoisomerases do tipo II bacterianas (ADN girase e topoisomerase IV), bloqueando os processos que envolvem a separação das cadeias de ADN, induzindo alterações incompatíveis com a vida [3]. A figura 1.3 esquematiza sumariamente este mecanismo.

No que diz respeito à farmacocinética (ciclo geral dos medicamentos) das quinolonas fluoradas, estas são rapidamente absorvidas após a administração por via oral. No entanto, no caso particular da norfloxacin ocorre menor absorção gastrointestinal, embora rápida (biodisponibilidade absoluta: $\approx 40\%$). Estima-se que uma hora após a administração de uma dose de 400 mg sejam atingidas concentrações séricas de 1,5 $\mu\text{g/ml}$. Após metabolismo parcial (a forma não metabolizada corresponde a mais de 70% do total eliminado), a norfloxacin é excretada por via biliar e renal, sendo encontrada na urina como composto original e sob a forma de 6 metabolitos ativos com ligeira eficácia antibacteriana [5]¹.

¹ http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9675&tipo_doc=rcm

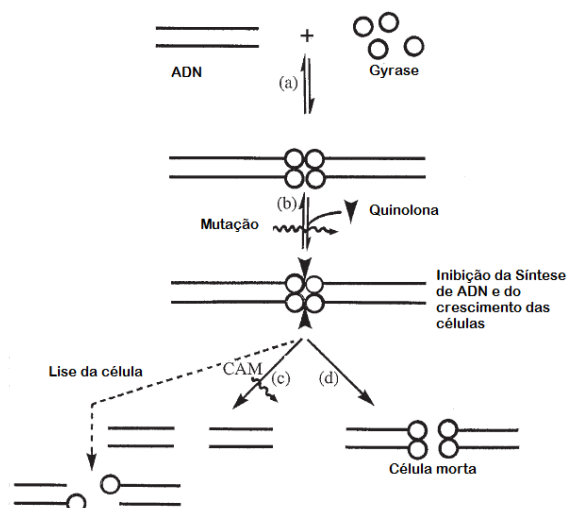


Fig. 1.3: Esquema de ação das quinolonas na replicação do DNA, adaptado de [4].

1.2.2 Trimetoprim

O trimetoprim (TMP), uma diaminopirimidina, é um análogo estrutural da porção pteridina do ácido hidrofólico. É utilizado frequentemente em associação com o sulfametoxazol, uma vez que apresentam um efeito sinérgico. São antibióticos de largo espectro, para bactérias Gram negativas e Gram positivas, clinicamente utilizados no tratamento de infecções urinárias, prostatites, infecções do trato intestinal e exacerbações da bronquite [1].

A estrutura molecular do TMP, também conhecido como 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibenzil)-pirimidina, está representada na figura 1.4.

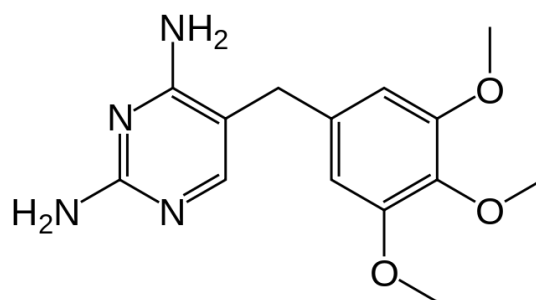


Fig. 1.4: Estrutura molecular do trimetoprim [6].

Relativamente à farmacocinética, o trimetoprim é eficazmente absorvido e bem difundido pelos tecidos. Uma a quatro horas após a administração oral de 160 mg são atingidas concentrações séricas máximas de 1-2 $\mu\text{g/ml}$. Sofre metabolização hepática originando metabolitos oxidados e hidroxilados e a sua eliminação ocorre predominantemente por via renal. Apenas pequenas quantidades são excretadas nas fezes por via biliar. Por norma, 50-60% do trimetoprim correspondentes a uma dose oral são excretados na urina em 24 horas e cerca de 80% apresenta-se

na forma não metabolizada [7]².

O seu mecanismo de ação baseia-se na inibição competitiva da hidrofolato redutase, a enzima que converte o dihidrofolato em tetrahidrofolato, impedindo a formação de compostos importantes para síntese de proteínas, DNA e RNA, logo, combatendo o crescimento bacteriano. A dihidrofolato redutase está presente tanto nos mamíferos como nas bactérias. No entanto, a afinidade do trimetoprim pela enzima bacteriana é de aproximadamente 20 a 60 mil vezes maior do que pela dos mamíferos [8]³.

1.3 Métodos de detecção da Norfloxacin e Trimetoprim

1.3.1 Necessidade de detecção de fármacos

Os antibióticos são aplicados em situações de doenças ou problemas de saúde, mais ou menos graves, que por vezes são prescritos em formas menos corretas. Nem sempre são administrados em condições realmente necessárias e em doses adequadas.

O uso abusivo de antibióticos contribui para um aumento da resistência dos microorganismos a estes fármacos. Por outro lado, o seu grande consumo acarreta um outro problema que corresponde ao aparecimento no ambiente das substâncias ativas e dos seus metabolitos. Não é nenhuma surpresa que esses fármacos estão entre os contaminantes ambientais mais comuns [9].

Se por um lado o doseamento de antibióticos é importante do ponto de vista clínico, de forma a ministrar a dose mais adequada ao tratamento da enfermidade e estabelecer a dosagem própria, acompanhando a metabolização ao longo do tempo, controlar as intolerâncias e ainda a incompatibilidade do uso simultâneo de antibióticos, por outro é também importante desenvolver metodologias analíticas para o controlo ambiental.

A ocorrência de antibióticos no meio ambiente tem levado a uma crescente preocupação sobre os potenciais toxicológicos. O desenvolvimento de resistência a antibióticos foi detetada em microorganismos presentes em águas superficiais e subterrâneas afetadas por Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) [10]. Se os antibióticos transportados no ambiente de fontes humanas e animais levar ao aumento de bactérias resistentes a antibióticos, criam-se efeitos deletérios sobre a qualidade da água. Esta é uma questão importante mas está longe de ser resolvida. O uso de antibióticos também pode acelerar o desenvolvimento de

² http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=29842&tipo_doc=fi

³ <http://www.revista.inf.br/veterinaria12/revisao/pdf/AnoVII-Edic12-Rev70.pdf>

genes de resistência a antibióticos e bactérias, aumentando os riscos de saúde para os seres humanos e animais [11].

A principal fonte de antibióticos no meio ambiente é a excreção de substâncias ativas não metabolizadas por seres humanos e animais. Outras fontes podem incluir a eliminação destes fármacos não utilizados, fora do prazo de validade e ainda resíduos de processos de fabricação de produtos farmacêuticos [12].

Instalações de cuidados de saúde e hospitais são uma grande fonte conhecida de antibióticos para águas residuais municipais. Outros poluentes das águas superficiais e subterrâneas são efluentes de estações de tratamento de águas residuais [13], instalações industriais (incluindo indústrias farmacêuticas) e escoamento superficial a partir de operações de alimentação de animais.

A preocupação ambiental reflete a gravidade para a saúde pública da presença destes contaminantes no ambiente. Embora a maior parte dos efluentes destes centros sejam encaminhados para estações de tratamento é conhecido o mau desempenho dos processos de tratamento e conseqüentemente resultam níveis significativos de antibióticos nos efluentes das ETARs, os quais são descarregados nos meios aquáticos. O mesmo acontece com os efluentes das indústrias farmacêuticas e com as das instalações de produção [10].

Todas estas razões, contribuem para que hoje em dia exista uma grande preocupação na comunidade científica no que se refere ao desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e seletivos que permitam dosear os antibióticos presentes em diferentes matrizes.

1.3.2 Estudos de detecção da Norfloxacin

A norfloxacin (NFX) é um antibiótico do grupo das fluoroquinolonas. As formulações orais dos medicamentos que contêm norfloxacin encontram-se autorizadas em vários Estados Membros da União Europeia (UE), com diferentes nomes comerciais, para o tratamento de infecções, incluindo as infecções do trato urinário simples ou complicadas, infecções da próstata, gonorreia não complicada, vários tipos de gastroenterites e conjuntivites.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com auxílio das mais diversas técnicas analíticas, desde os princípios de caracterização do fármaco, até à detecção do mesmo em diferentes amostras. Na tabela 1.1, que se encontra no fim deste capítulo, estão registados sinteticamente alguns dos estudos realizados.

A eletroforese capilar, cromatografia líquida, espetofotometria, potenciometria e voltametria são algumas das técnicas usadas para a detecção da norfloxacin.

Os limites de detecção e quantificação oscilam de acordo com a técnica analítica, a preparação de amostra e a matriz em que será detetado. Por vezes as técnicas

não são de fácil uso, têm custos elevados e nem sempre é possível a sua aplicação à situação em causa. Por exemplo, se é necessário efetuar um teste em amostra de urina, algumas destas técnicas tornam-se de impossível aplicabilidade e exigem uma preparação de amostra morosa e laboriosa.

Mascher e Kikuta (1998)[25] realizaram um estudo para a detecção da NFX utilizando a cromatografia líquida. As metodologias desenvolvidas foram usadas na quantificação de NFX em plasma e urina.

Já, Pellegrini *et al* (2004) [26] desenvolveram um biosensor eletroquímico para a detecção e identificação de resíduos de medicamentos antimicrobianos, mais concretamente quinolonas, no leite. O estudo teve por base a medição da taxa de dióxido de carbono em relação à inibição do crescimento microbiano. Relativamente a outras técnicas, as técnicas eletroquímicas apresentam diversas vantagens, como análise em tempos muito curtos, uma diminuição do volume de amostras, boa precisão e garantem uma boa sensibilidade permitindo quantificar níveis vestigiais.

1.3.3 Estudos de detecção do TMP

O TMP tem como uso clínico a aplicação no tratamento das infeções urinárias, prostatites, infeções do trato intestinal e em algumas complicações das vias respiratórias.

Vários estudos têm sido desenvolvidos para análise deste fármaco. Por vezes, o estudo é associado ao sulfametoxazol, devido à administração ser frequentemente em conjunto. Na tabela 1.2, presente no final deste capítulo estão referidos alguns trabalhos desenvolvidos para a determinação do trimetoprim.

González *et al* (2011) utilizaram elétrodos de diamante no seu estudo para responder à necessidade da detecção do TMP no ambiente e à perceção da resistência antibacteriana entre os microorganismos [35].

Rebelo *et al* (2011) efetuaram um estudo em águas residuais, utilizando membranas seletivas. A potenciometria foi a técnica eletroquímica que aplicaram, conseguindo um limite de detecção de $4,01 \times 10^{-7}$ mol/L, garantindo que esta técnica é rápida e apresenta uma elevada precisão [6].

A detecção do TMP por cromatografia líquida acoplada à espetofotometria de massa foi usada para controlo de qualidade da carne [30].

A voltametria para o doseamento do TMP, foi outra das técnicas usadas envolvendo elétrodos de carbono vítreo, estudos com acoplação de grupos metálicos, nanotubos de carbono-nafion e em que foi possível atingir bons valores de limite de detecção [31].

Hu *et al* (2005) determinaram o TMP por cromatografia líquida, em amostras

de urina, e ainda em comprimidos [32].

1.3.4 Vantagens da detecção eletroquímica sobre outros métodos

O doseamento de antibióticos pode ser efetuado por vários métodos como referido no ponto anterior. De entre os mais frequentes, encontra-se a cromatografia líquida acoplada a diferentes detetores. Estes métodos requerem normalmente um passo prévio de tratamento de amostra. Esta exigência torna a metodologia analítica morosa e os custos são elevados. Por outro lado, a necessidade de reduzir os limites de detecção impõe a procura de novos métodos e novas técnicas.

Os métodos eletroquímicos apresentam diversas vantagens comparativamente a outras técnicas da química analítica. Com técnicas eletroquímicas é possível obtermos graus de sensibilidade e seletividade superiores. O fácil uso, o baixo custo exigido para a aplicação da eletroquímica e ainda a rápida análise são fatores favoráveis à sua aplicabilidade.

1.4 Sensores

Um dos objetivos principais da química analítica é desenvolver métodos que permitam rapidez, seletividade e sensibilidade na detecção de analítos. Nesse contexto o desenvolvimento de sensores tem tido uma relevada importância no desenvolvimento da investigação científica.

Um sensor químico pode ser definido como um dispositivo pequeno que, como resultado de um processo de interação química, transforma informação química ou bioquímica num sinal que permite a análise qualitativa ou quantitativa dum analíto. Contém três elementos: um elemento sensorial (designado por elemento de reconhecimento), um transdutor e um processador. A função do transdutor é de transformar o sinal obtido pelo elemento sensorial num sinal elétrico. Os transdutores eletroquímicos potenciométricos e voltamétricos são alguns dos exemplos [36].

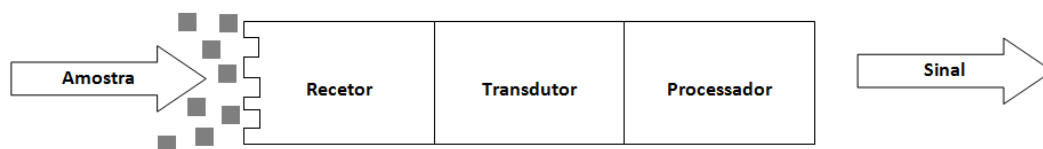


Fig. 1.5: Estrutura de um sensor.

Novos sensores químicos estão continuamente a ser desenvolvidos. Um sensor químico pode ser definido como um dispositivo pequeno que, como resultado

de um processo de interação química, transforma informação química ou bioquímica num sinal que permite a análise qualitativa ou quantitativa dum analito. Contém três elementos: um elemento sensorial (também designado elemento de reconhecimento), um transdutor e um processador.

Os sensores utilizados para o reconhecimento devem ser tanto melhores quanto o nível de exigência e necessidade do analito a detetar. Algumas das características mais importantes para os sensores são: uma boa seletividade e especificidade, a ausência de interferências durante o funcionamento, um curto tempo de resposta e monitorização, a reduzida quantidade de amostra. Todos estes aspetos são importantes para o sucesso no desenvolvimento de um sensor, como se pode verificar na figura 1.6 [36].

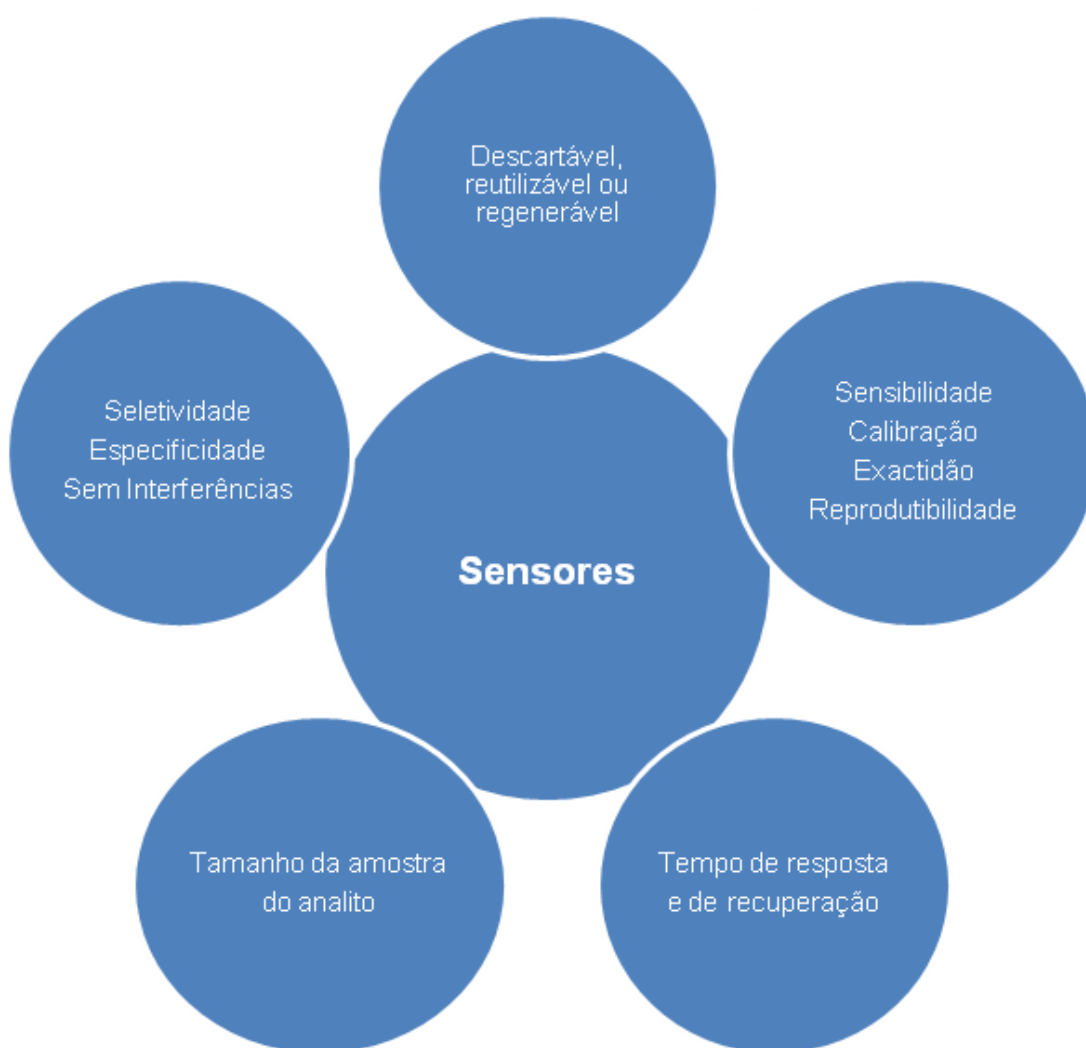


Fig. 1.6: Características importantes para a escolha de um sensor (adaptado de [36]).

Nas últimas décadas têm sido desenvolvidos sensores químicos modificados por um elemento biológico de reconhecimento, designando-se por biossensores. Um biossensor é geralmente definido como um dispositivo de análise que con-

verte a resposta biológica de um sinal quantificável e processável [37].

1.4.1 Sistemas de Reconhecimento

O reconhecimento de um analíto por um sistema deve-se ao facto das características do primeiro serem compatíveis e associáveis com as do segundo.

Existem diversos sistemas de reconhecimento. Como exemplo de um sistema de deteção química podemos considerar os polímeros molecularmente impressos (MIPs), em que as deteções são realizadas pela interação de ligações entre as moléculas a detetar. Os biossensores funcionam com uns biorreceptores apropriados a cada tipo de analíto em questão. Se se pretender detetar uma bactéria, utilizar-se-ia um anticorpo, bem como, se se necessitar detetar uma enzima, recorrer-se-ia a um substrato.

1.4.2 Sistemas de Transdução

Os avanços nos métodos de transdução estão intimamente ligadas com o desenvolvimento em áreas como eletrónica e computação. Existem diferentes tipos de transdutores, dependendo da propriedade físico-química (electrões transferência, mudança de massa, a transferência de calor) [38].

As três classes principais de transdutores são: os sensores electroquímicos (que funcionam pela electrólise de espécies que ocorre da oxidação-redução), os sistemas óticos (baseados na medição da luminescência ou fluorescência) e técnicas de deteção de massa (variação de massa e/ou microviscosidade). A escolha do transdutor depende do analíto utilizado e das propriedades da amostra. O elemento de reconhecimento biológico pode identificar-se e ligar-se especificamente ao analito alvo. Esta deteção pode formar um sinal que passa através do transdutor.

1.4.3 Sistemas de Eletroquímicos

Os dispositivos eletroquímicos são altamente sensíveis, baratos, fáceis de usar, portáteis e compatíveis com tecnologias de microfabricação, relativamente a outros sistemas de transdução.

O princípio básico deste tipo de sensores é o fluxo de electrões entre uma espécie eletroativa e a superfície de um eléctrodo (submetido a um padrão pré-definido de potencial fixo ou variável). A corrente resultante pode ser medida através de diferentes técnicas eletroquímicas. De acordo com a natureza da transdução, os dispositivos eletroquímicos utilizados podem ser potenciométricos, voltamétricos, amperométricos ou impedimétricos. Devido à sua alta sensibilidade, es-

pecificidade, análise rápida e exata, estes transdutores eletroquímicos deram um grande impulso no desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico [39].

1.5 Técnicas Eletroquímicas

1.5.1 Princípios de Electroquímica

As técnicas electroquímicas utilizadas na análise qualitativa e quantitativa de qualquer composto químico que seja eletroativo, isto é, que possa ser oxidado e/ou reduzido. Com esta técnica podem ser efetuados estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em vários eletrólitos, processos de adsorção em diferentes materiais e mecanismos de transferência eletrônica em superfícies de eletrodos modificados quimicamente.

Os processos de oxidação-redução que ocorrem nos eletrodos, heterogêneos por natureza, são feitos processos de troca de elétrons na interface solução/elétrodo, quer estejam em equilíbrio na interface ou sob o controle cinético total ou parcial. Na maior parte dos processos de transferência de carga há troca de elétrons, podendo as reações ser representadas, no caso mais simples que envolve apenas a espécie oxidada (O) e a espécie reduzida (R), ambas solúveis em solução, por:



onde O recebe n elétrons para se transformar na espécie R.

Os elétrons no eletrodo têm uma energia máxima que é distribuída à volta do nível de Fermi, E_F : os elétrons podem ser fornecidos ou recebidos apenas à volta deste nível de energia [40].

O E_F pode ser alterado pela aplicação de um potencial ao eletrodo que tem como consequência a remoção ou a cedência de elétrons ao eletrodo. O processo de transferência de elétrons pode ser visualizado através da figura 1.7. Para que ocorra o processo de redução, os elétrons no eletrodo devem ter uma energia mínima de modo a poderem ser transferidos do eletrodo para a orbital aceitadora de elétrons da espécie O. Para que ocorra o processo de oxidação, a energia dos elétrons na orbital dadora de elétrons de R tem que ser igual ou superior à energia dos elétrons no E_F do eletrodo.

Estas energias correspondem aos potenciais do eletrodo que podem ser medidos relativamente a eletrodos de referência adequados. As energias correspondentes às orbitais no par O/R são os seus potenciais redox, que não são necessariamente iguais devido às pequenas diferenças de energia que podem surgir pela distância da superfície do eletrodo até às espécies O ou R.

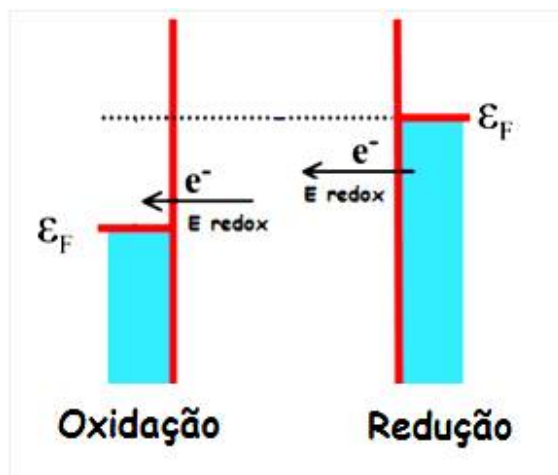


Fig. 1.7: Esquema dos níveis de Fermi na equação de oxidação redução [40].

Como consequência a corrente produzida, que é diretamente proporcional ao número de elétrons transferidos, é proporcional à concentração da espécie eletroativa presente junto à superfície do eletrodo [40].

As reações eletroquímicas podem ser bastante complicadas e envolvem uma sequência de várias etapas, sendo a velocidade determinada pelo passo mais lento. As reações mais simples envolvem três etapas: o transporte de massa da espécie eletroativa para a superfície do eletrodo, a transferência eletrônica através da interface e o transporte do produto de volta para o seio da solução. A velocidade global da reação e como consequência a intensidade de corrente medida, pode ser limitada pela velocidade do processo de transporte de massa do reagente para o eletrodo ou pela velocidade do processo de transferência eletrônica. O facto da velocidade de uma reação ser limitada pelo processo de transferência eletrônica ou de transporte de massa depende do composto em análise e das condições experimentais (material de eletrodo, solvente, escala de tempo, oscilações energéticas na rede e variações de temperatura).

Reações mais complexas incluem processos químicos em solução e/ou processos adicionais à superfície do eletrodo, que precedem ou se seguem à transferência eletrônica.

As técnicas eletroquímicas existentes são: a amperometria, potenciometria, espectrometria de impedância e condutimetria. De seguida são apresentadas apenas as técnicas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

1.5.2 Voltametria

A voltametria baseia-se no registo da curva de corrente-potencial (voltamograma) obtida pela eletrólise de uma espécie em que a intensidade de corrente que flui através de um eletrodo é medida em função do potencial (E) aplicado a esse

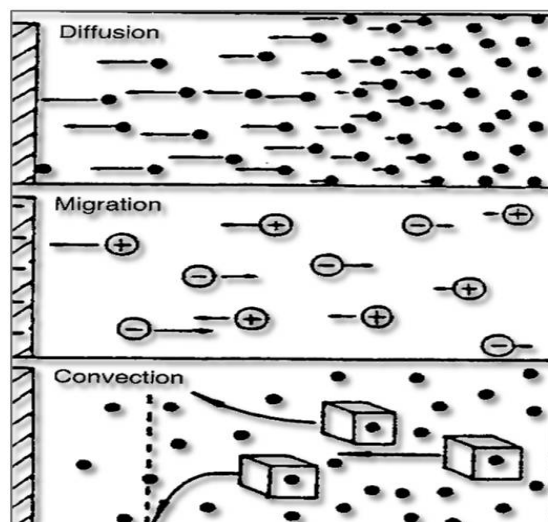


Fig. 1.8: Processos de transporte de massa das espécies do seio da solução para a superfície do eletrodo [41] e [38].

eletrodo. Compreende um grupo de técnicas eletroanalíticas em que os fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície fornecem informações sobre o analito. Estas informações são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao ser aplicada uma diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar, sob condições de completa polarização do eletrodo de trabalho. A corrente resultante é constituída por duas componentes: a corrente faradaica (corrente relativa à reação de oxidação-redução da espécie em estudo) e a corrente residual. Esta corrente residual deve-se a uma corrente faradaica gerada pela presença de impurezas nos eletrodos, por reagentes usados ou pela presença de O_2 dissolvido no meio ou por uma corrente capacitiva, relacionada com cargas e descargas que podem existir sob o eletrodo de trabalho. A interferência do O_2 pode ser eliminada através do desarejamento da solução, borbulhando um gás inerte de elevada pureza, como por exemplo o N_2 .

Uma vez que o potencial no eletrodo de trabalho varia com o tempo, surge o termo sinais de excitação, que são funções potencial-tempo, e representam a variação do potencial ao longo do tempo [42].

A escolha da técnica voltamétrica está relacionada com o tipo e a qualidade de informação quantitativa e/ou qualitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o eletrodo de trabalho. Em seguida, serão feitas resumidamente algumas considerações teóricas sobre as técnicas de voltametria cíclica e de voltametria de onda quadrada.

Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (CV) é a técnica mais utilizada para obter toda a informação qualitativa de reações eletroquímicas. Esta técnica tem a capacidade de fornecer rapidamente a informação termodinâmica de processos redox, da cinética de reações de transferência eletrônica heterogênea e também informação cinética de reações químicas acopladas ou de processos de adsorção. Particularmente, a CV permite uma rápida detecção dos potenciais de oxidação-redução das espécies e uma avaliação do efeito do meio nos processos redox.

A CV consiste na aplicação de um varrimento de potencial. Parte-se de um determinado potencial e faz-se o varrimento por uma determinada gama de potenciais. Depois inverte-se o sentido, ou seja, efetua-se o varrimento no sentido inverso da mesma gama. O ponto de partida e de chegada são o mesmo, como se verifica na figura 1.9. A corrente é excitada na forma triangular.

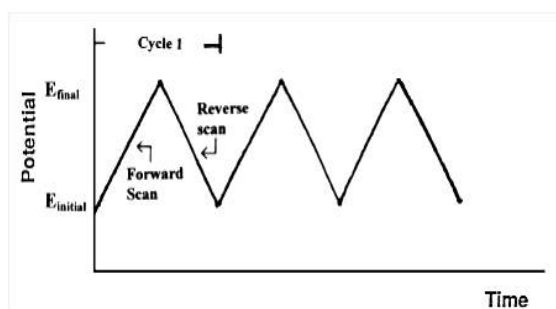


Fig. 1.9: Sinal de excitação em voltametria cíclica [38]

Aplicando a CV obtém-se um voltamograma como o que se apresenta na figura 1.10. Os parâmetros mais importantes num voltamograma obtido por esta técnica são os potenciais de pico catódico e anódico e as intensidades de corrente do pico catódico e anódico.

Como demonstra a figura 1.10, quando se faz o varrimento de potencial catódico e logo seguido do anódico, a espécie reduzida que se formou no ciclo catódico pode ser oxidada segundo a reação inversa, obtendo-se por isso dois picos no voltamograma. Quando um voltamograma do sentido catódico não é exatamente inverso ao sentido anódico, o sistema torna-se irreversível, ou quasi-reversível. Parâmetros cinéticos podem ser inferidos da forma dos voltamogramas.

Voltametria de onda quadrada

A utilização de técnicas voltamétricas na análise de moléculas biológicas está intimamente relacionada com o desenvolvimento de métodos mais sensíveis. A voltametria de onda quadrada (SWV) tem sido amplamente empregada para este fim, sendo umas das técnicas eletroquímicas mais rápidas e sensíveis. Os

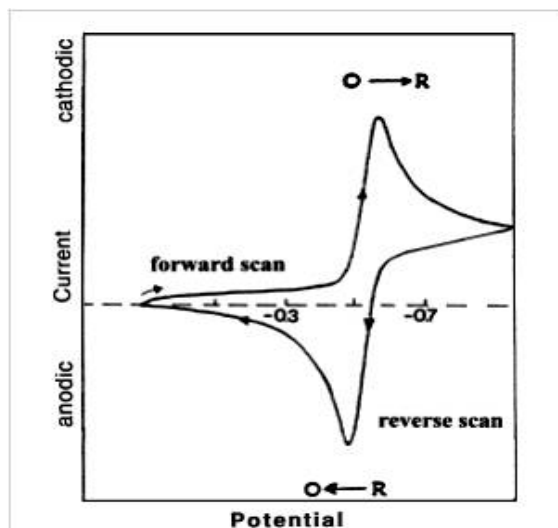


Fig. 1.10: Voltamograma cíclico típico para um sistema reversível [38]

limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo do eletrodo.

Na SWV, o sinal de excitação é obtido através da sobreposição da sequência de impulsos com o sinal em forma de escada. A medida da corrente é feita duas vezes em cada ciclo, uma vez no fim do impulso direto e outra no fim do impulso inverso, como se observa na figura 1.11.

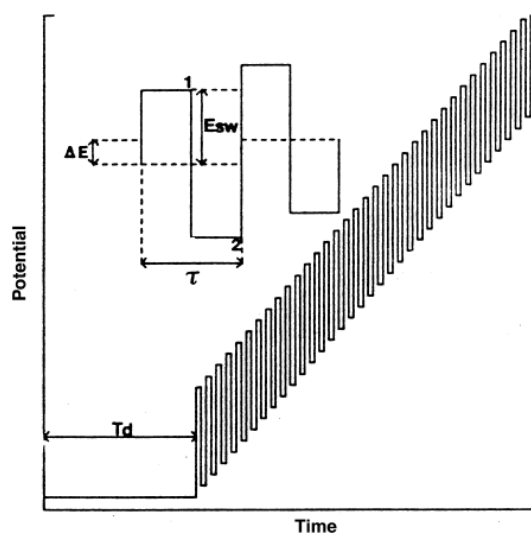


Fig. 1.11: Forma de onda na voltametria de onda quadrada [38]

No voltamograma de onda quadrada observa-se a corrente resultante, isto é, a diferença entre as correntes diretas e inversas, que quanto maior a reversibilidade da reação, maior é a contribuição da corrente inversa, aumentando significativamente a corrente resultante e, conseqüentemente, a resposta em termos de intensidade de corrente [43], como se pode verificar pela figura 1.12.

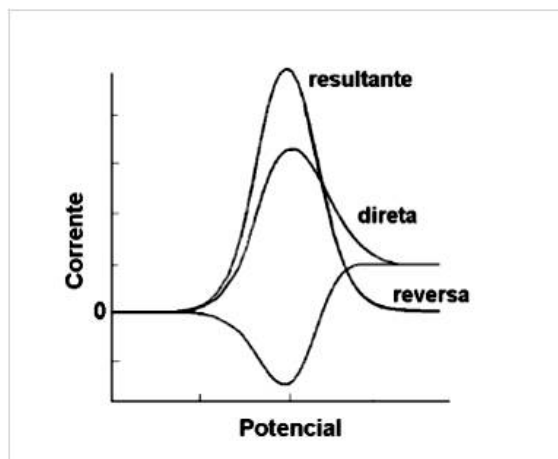


Fig. 1.12: Voltamograma esquemático de onda quadrada para um processo de oxidação-redução reversível[43].

Este tipo de voltametria apresenta como vantagem principal a sua elevada sensibilidade. Além disso, a utilização de altas velocidades de varrimento nas análises permite o encurtamento de tempos de análise e gradientes de concentração maiores dos que são encontrados na maioria das restantes técnicas voltamétricas [42].

1.5.3 Impedância

A impedância (Z) é uma técnica usada para descrever uma resistência obtida pela corrente alternada (AC). Apesar da sua alta aplicabilidade em estudos de propriedades eletroquímicas do material, a aplicação da Z para a caracterização de sensores eletroquímicos só nos últimos anos teve um aumento significativo na quantidade de trabalho nesta área.

Nesta técnica, é aplicada uma pequena perturbação sobre o eléctrodo de trabalho. O sinal aplicado aos eléctrodos é baseado na AC. Esta perturbação ocorre apenas na proximidade do equilíbrio, ao contrário dos métodos descritos anteriormente para o varrimento linear em que o sistema é perturbado longe do equilíbrio [44].

A lei de Ohm é usada para fazer a relação entre o potencial e corrente aplicada.

$$E = I \times R \quad (1.2)$$

em que E é o potencial (em V), que atravessa uma resistência, R (em Ohm), resultando numa corrente, I (em A). Se o sinal for de corrente alternada, a resposta de um circuito para um regime sinusoidal forçada é dada pela lei de Ohm generalizada.

$$E = I \times Z \quad (1.3)$$

$$I = (1/Z) \times E = Y \times E \quad (1.4)$$

onde Z é a impedância do circuito (em Ohm) e Y é a admitância.

A impedância, Z , é o factor de proporcionalidade entre o potencial E e I . A impedância de corrente é constituída por resistências de reatância (derivado de elementos capacitivos) e indutâncias. Uma vez que a impedância é uma quantidade complexo, a sua representação pode ser feita de várias maneiras [40].

No caso da corrente alternada, o potencial e a corrente variável com o tempo são tipicamente representados por uma onda sinusoidal.

Muitos processos de eletrodos são mais complexos do que os descritos acima. Um diagrama de Nyquist ideal, apresenta um semicírculo na região de altas frequências e uma variação linear nas médias e baixas frequências, como se observa na figura 1.13. Na região de altas frequências, o efeito de relaxação de transferência de carga é mostrada por um semicírculo, que podem ser obtidos valores de R_s e R_p . Em que R_s é a resistência do eléctrodo e electrólito e podem ser obtidos por primeiro cruzamento do semicírculo com o eixo real. O segundo cruzamento do semicírculo da linha real, é o valor de $R_s + R_p$ em que R_p é a resistência de transferência de carga associada à interface polímero/electrólito [45].

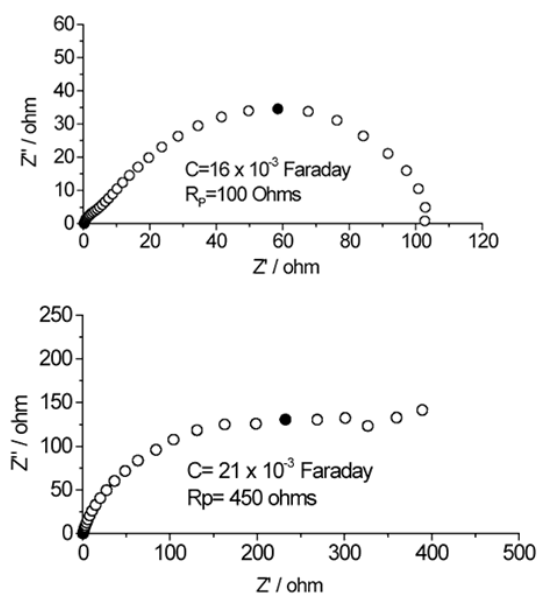


Fig. 1.13: Representação de estudo de impedância eletroquímica [46].

1.6 Sistema Voltamétrico

Os sistemas voltamétricos assentam na utilização de potenciostatos que servem para controlar o potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho e permitem a medição da intensidade de corrente que se estabelece numa célula eletroquímica constituída por três eléctrodos, como se observa na figura 1.14.

1. Eléctrodo de trabalho, WE, de área superficial reduzida, onde ocorrem os fenómenos eletroquímicos que se pretendem estudar.
2. Eléctrodo de referência, RE, usado para controlar com rigor o potencial imposto ao eléctrodo de trabalho.
3. Eléctrodo auxiliar, CE, utilizado para completar o circuito eléctrico por onde circula a intensidade de corrente resultante.

Na célula, a corrente passa entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo auxiliar, evitando que ocorram distúrbios no eléctrodo de referência de modo a este assegurar o seu papel, que é o de manter o seu potencial constante durante as medidas, sem interferências. O facto da área do WE ser menor, faz com que ele se polarize, isto é, assumo o potencial que lhe é aplicado. O RE, por possuir uma área grande não se polariza e mantém o seu potencial constante.

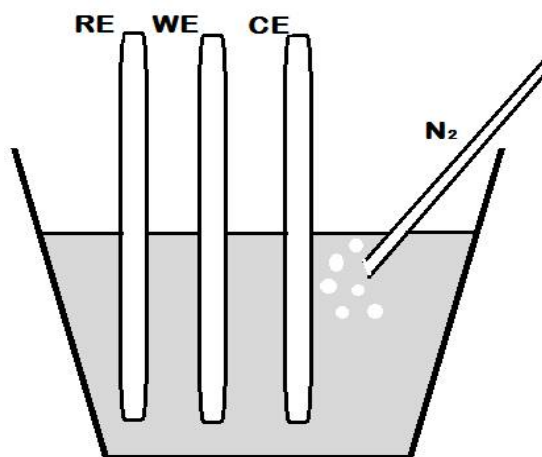


Fig. 1.14: Representação esquemática de uma célula eletroquímica com três eléctrodos: eléctrodo de trabalho (WE), eléctrodo de referência (RE) e eléctrodo auxiliar (CE).

Nesta célula, os eléctrodos são ligados a um amplificador operacional, pertencente ao circuito electrónico do potenciostato. O amplificador operacional atua quando é aplicada uma diferença de potencial entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência sob a forma de varrimento, fazendo com que a resistência do eléctrodo de referência aumente e a do eléctrodo secundário diminua, de modo

que a corrente passe entre o eletrodo de trabalho e o secundário, evitando a polarização do eletrodo de referência que realizará o seu papel sem interferências, mantendo, assim, o seu potencial constante durante as medições. Entre os eletrodos de trabalho, os mais utilizados são os eletrodos de carbono, principalmente o de carbono vítreo, pois têm a janela de potencial mais extensa na região anódica. Um bom eletrodo de trabalho deve ser inerte (janela de potencial larga), ter uma boa condutividade elétrica, ter um comportamento voltamétrico com elevada razão entre sinal e o ruído, não pode ser tóxico e deve ser barato [47].

A escolha do eletrodo de trabalho é importante para o desempenho da técnica voltamétrica, nomeadamente na construção de biossensores. Atualmente, o desenvolvimento de eletrodos de trabalho quimicamente modificados veio minimizar várias limitações que os sensores eletroquímicos tradicionalmente apresentavam, nomeadamente, a passivação gradual da sua superfície, a cinética de transferência de eletrões entre os analitos e os materiais dos eletrodos que é demasiado lenta e a dificuldade em discriminar, entre compostos, alvos que possuam características de oxidação-redução similares [48].

1.6.1 Eletrodo de Carbono Vítreo

O eletrodo de carbono vítreo (GCE) tem sido muito popular pelas excelentes propriedades mecânicas e elétricas, pela grande janela de potencial que pode ser aplicada, pela inércia química, ou seja, pela resistência que apresenta à maioria dos solventes e pelo desempenho de reprodutibilidade [38].

A estrutura do GCE envolve finas camadas, como se amaranhadas com ligações cruzadas de grafite que pode visualizar-se na figura 1.15. Devido à sua densidade e pequeno tamanho do poro nenhum processo de impregnação é exigido. No entanto, é necessário aplicar-se um pré-tratamento de superfície para criar uma ativação na superfície do eletrodo, de modo a permitir reprodutibilidade no GCE e melhorar o seu desempenho analítico.

O pré-tratamento é realizado pelo polimento do eletrodo numa camurça, em movimentos sucessivos, na presença de alumina de reduzida granulometria. Posteriormente deve ser lavado com água ultrapura e levado a ultrassons para remoção de impurezas. Para concluir o processo deve aplicar-se uma limpeza eletroquímica, com sucessivos varrimentos de potencial numa solução de ácido sulfúrico.

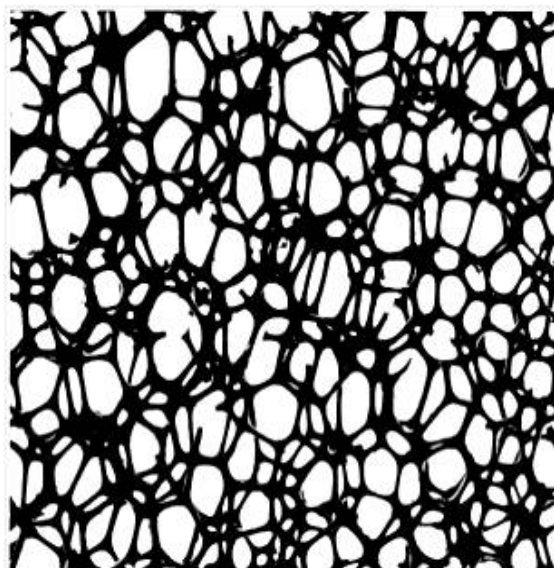


Fig. 1.15: Estrutura de poros abertos de um elétrodo de carbono vítreo [38].

1.7 Elétrodos Modificados

1.7.1 Polímero Molecularmente Impresso

A impressão molecular é uma técnica utilizada para a preparação de polímeros com uma seletividade pré-determinada para a molécula alvo. A excelente capacidade de reconhecimento molecular do polímero impresso para a molécula alvo é comparável ao anticorpo-antígeno ou enzima-substrato [49].

O reconhecimento molecular é definido como a capacidade de uma molécula se ligar a outra que apresenta uma forma complementar com a primeira. Os polímeros com capacidade de reconhecimento molecular (designados na literatura anglo-saxónica molecularly imprinted polymers - MIPs) encontram-se atualmente bem definidos. Consistem em matrizes macromoleculares sintéticas, obtidas com base em métodos de moldagem molecular, que apresentam a capacidade de reconhecer seletivamente moléculas importantes do ponto de vista biológico, como fármacos, proteínas e biomoléculas [50], [51] e [52]. Com efeito, as tecnologias baseadas na moldagem molecular permitem disponibilizar sistemas poliméricos eficientes, com capacidade para reconhecer moléculas bioativas específicas, em que a interação depende das propriedades e da concentração da molécula molde presente no meio circundante.

Embora estes materiais ainda não tenham alcançado uma aplicação clínica no domínio do controlo da libertação de fármacos, vários autores referem que esta tecnologia apresenta grande potencial para as técnicas analíticas de controlo [53] e [54].

Outra razão que tem vindo a promover o interesse pelos MIPs reside no facto

de estes poderem mimetizar recetores biológicos em estudos de desenvolvimento de novas substâncias com atividade farmacológica e poderem detetar substâncias específicas em fluidos biológicos (como por exemplo, nos testes de deteção de drogas de abuso) [55] e [56].

Nesta última década, como se verifica na figura 1.16 o número de publicações sobre MIPs tem crescido de uma forma alucinante, o que demonstra um grande interesse para a comunidade científica. O que se verifica também no gráfico é que existe uma diferença entre os MIPs preparados quimicamente ou por eletropolimerização. Deste modo, percebe-se que existem diferentes modos de polimerização, como se descreve de seguida.

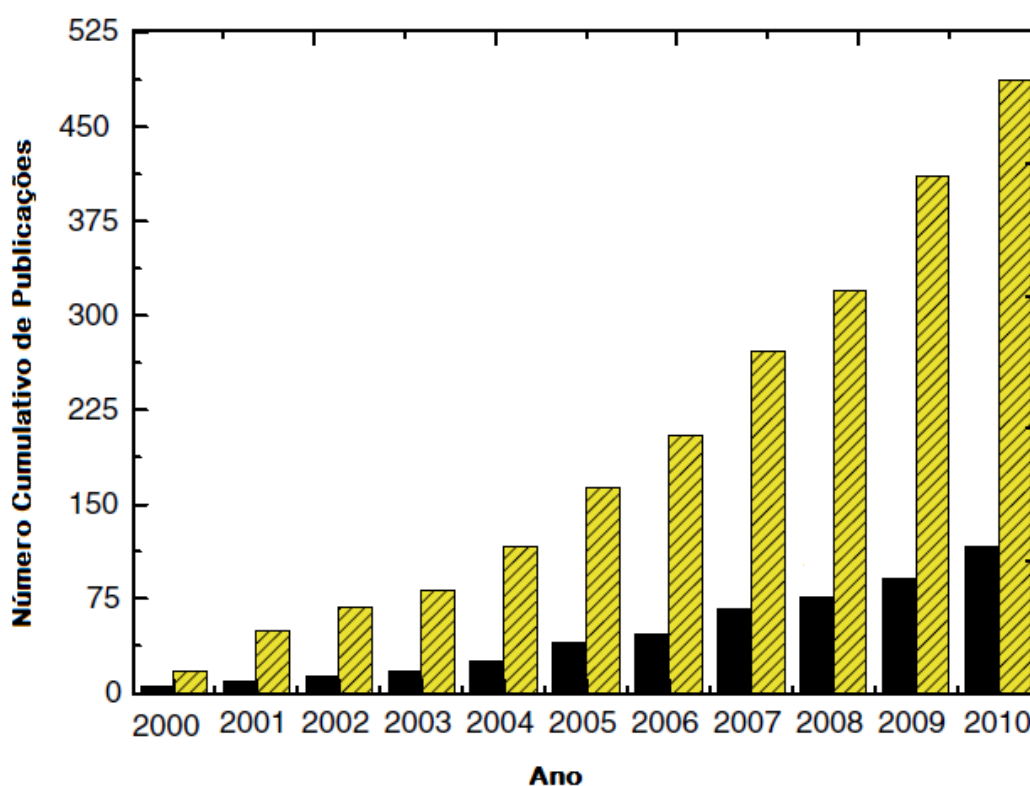


Fig. 1.16: Gráfico representativo do número cumulativo de publicações sobre MIPs por ano, baseados em: amarelo-sensores químicos; preto-eletropolimerização [57].

A polimerização pode ser realizada de diferentes formas e tendo em consideração os mais diversos fatores relacionados com o crescimento da cadeia, os monómeros, pesos moleculares, reticulação, iniciadores, entre outros.

Uma polimerização por *radicais livres* acontece por um crescimento de cadeia. Este tipo de polimerização caracteriza-se em três etapas distintas: iniciação, propagação e fim. Existe um iniciador para o início da formação da cadeia. Logo que esta reação acontece, em poucos segundos a cadeia é formada adquirindo um elevado peso molecular antes de ocorrer o processo de término.

Já uma *copolimerização por radicais livres* consiste na polimerização de diferentes monómeros. Esta técnica é interessante pela possibilidade de obtenção de polímeros com características químicas diferentes. Esta polimerização exige uma especial atenção pela necessidade de serem considerados os diferentes pesos moleculares e as velocidades de reação para as reações poliméricas [58].

A concepção e síntese de MIPs constitui por si só um processo complexo, cuja complexidade se torna ainda mais acentuada pelo número de variáveis experimentais que lhe são inerentes como, a natureza e a concentração da molécula-molde, monómeros funcionais, agentes de reticulação, solventes, iniciadores e os próprios processos de moldagem molecular [3].

A síntese eletroquímica de MIPs é realizada pela aplicação de técnicas voltamétricas, como a voltametria cíclica ou potenciométrica.

O processo geral da impressão molecular consiste numa combinação das moléculas alvo, como os monómeros funcionais, por uma solução matriz como se verifica na figura 1.17. Aplica-se um potencial ou janela de potenciais de varrimento para polimerização. Por fim, efetua-se a remoção das moléculas alvo do polímero molde, deixando uma cavidade capaz de religação.

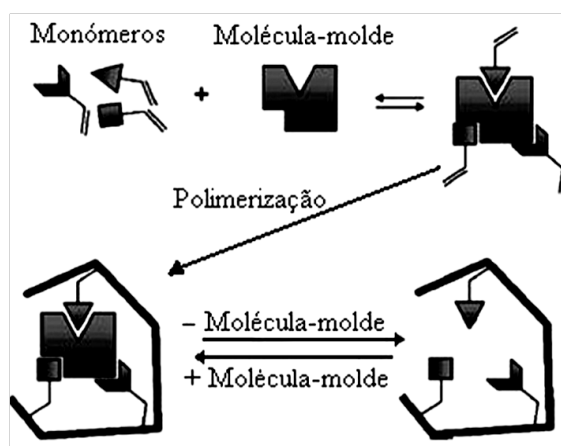


Fig. 1.17: Esquema de polimerização e de reconhecimento molecular [59].

O desenvolvimento de MIPs pode ser preparado baseando-se em ligações covalentes e não covalente. Na impressão molecular recorre-se com maior frequência a interações não covalentes devido à maior facilidade de ligação e remoção entre o polímero e os analitos [60].

A preparação deste MIPs por eletropolimerização pode apresentar diversas vantagens sobre os MIPs que são preparados por polimerização de radicais livres. Por exemplo, a espessura da película pode ser convenientemente controlada durante a eletropolimerização pelos parâmetros eletroquímicos. Além disso, a aplicação de solventes adequados, bem como a aplicação de eletrólitos de suporte,

pode ajustar as propriedades viscoelásticas e de porosidade dos filmes [3].

A estabilidade química e mecânica, a facilidade de preparação e o custo relativamente baixo dos polímeros, tornam-nos atraentes para aplicações analíticas. São utilizados em colunas de separações cromatográficas [61], em microextrações em fase sólida [62] [63] e em reconhecimento de moléculas em sensores eletroquímicos [64], [65] e [66].

1.7.2 Pirrol utilizado na construção de MIPs

Os monómeros eletroativos podem polimerizar de forma a permitir a obtenção de polímeros condutores ou não condutores. O maior grupo existente consiste em polímeros eletronicamente condutores (ECPS).

Os ECPS são polímeros com propriedades eletrônicas como propriedades magnéticas, propriedades de condução e propriedades ópticas, similares a alguns metais.

O Poliacetileno, polipirrol, polianilina, são três exemplos de polímeros condutores. Pelo contrário, o polifenol, o poliaminofenol e a polifenilenodiamina são três exemplos de polímeros não condutores.

Devido às suas propriedades eletroquímicas únicas, os ECPS surgem com interesse considerável no desenvolvimento de sensores e biosensores.

Nos diferentes ECPS, o polipirrol (PPy) tem sido amplamente utilizado na preparação de MIPs devido à sua excelente biocompatibilidade e pela facilidade de imobilização de diferentes compostos biológicos. A sua estrutura química é representada na figura 1.18.

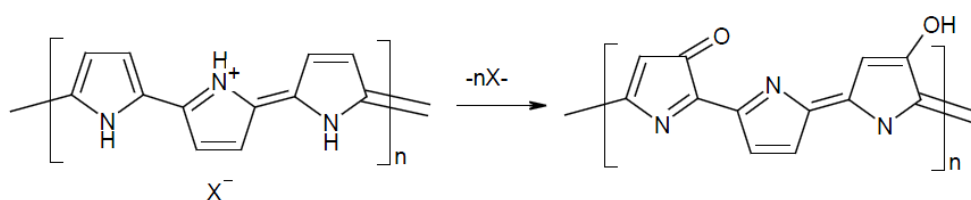


Fig. 1.18: Estrutura química do pirrol [67].

O PPy é sobreoxidado em potenciais positivos, considerado normalmente como indesejado, isto porque esta oxidação resulta na perda de condutividade e alguns efeitos na estabilidade. Embora estas desvantagens sejam reais, a sobreoxidação tem sido usada nas mais diversas aplicações eletroquímicas.

O polipirrol sobreoxidado molecularmente impresso (MIOPPy) em camadas ultrafinas sobre a superfície de eléctodos de carbono vitreo foi utilizado para a determinação de adenosina e de adenosina 5-trifosfato (ATP). As interações eletrostáticas entre ATP e o PPy positivamente carregado, influencia a resposta

dos filmes do MIOPPy. As camadas aplicadas apresentam uma espessura fina para assegurar a elevada permeabilidade. Deste modo, os problemas relacionados com a deteção em películas mais espessas foram eliminados. A resposta do sensor é assim controlada pelas interações entre o analíto e o polímero de pirrol, em vez da quantidade de analíto existente na película [68].

O OPPy tem sido usado para impressão de aminoácidos [69], [70], [71] e foi desenvolvido o polipirrol molecularmente impresso, MIPPy, capaz de reconhecer o ácido L-Glutâmico detetado por voltametria cíclica. A tabela 1.3, que se encontra no final do presente capítulo, reúne alguma informação referente ao uso de MIPs com PPy.

1.7.3 Nanomateriais

O campo da nanociência e nanotecnologia compreende dimensões na ordem de 1 a 100 nm o que possibilita entender, controlar e explorar a matéria desde o momento da sua origem ou síntese contribuindo, desta forma, para intervir no processo original e decidir em que etapa de crescimento se presta uma dada estrutura ou sistema em desenvolvimento, em função das suas propriedades físicas e químicas. A exploração destas propriedades pode assegurar a criação de dispositivos a nível atómico, molecular e supramolecular, o que constitui requisito essencial para as linhas de produção de qualquer área de interesse. Portanto, a nanociência toma como ponto de partida as propriedades atômicas e moleculares, governadas pelas leis insólitas da mecânica quântica para e, a partir destas, conceber e construir sistemas com propriedades ou desempenhos desejáveis [76].

O estudo e desenvolvimento de nanomateriais, tem permitindo a construção de dispositivos revolucionando as indústrias tradicionais, tais como aeronáutica, automóvel, ferramentas, eletrónica, dispositivos médicos, motores elétricos, transistores, microchips, entre outros. Manipulando átomos e moléculas individualmente, será possível melhorar um dado material, modificando as suas propriedades, tais como a condutividade, as propriedades ópticas, magnéticas e termais.

Nas últimas duas décadas, a biotecnologia e o campo médico têm alcançado notáveis avanços no desenvolvimento de novas tecnologias e aberto novos horizontes no sentido de identificar e quantificar biomoléculas, além de contribuir para o diagnóstico de doenças em níveis antes inalcançáveis. Neste sentido, o desenvolvimento e a utilização de nanoestruturas como ferramentas no entendimento de processos biomimétricos tem ganho notoriedade junto da comunidade científica nas últimas décadas [77] e [78].

Muitos são os nanomateriais atualmente existentes ou em fase de investigação:

desde nanotubos de carbono, nanoprtículas, soluções de grafeno e suspensões metálicas.

Os nanotubos de carbono (CNT) são estruturas mais ou menos complexas, à base de reticulações organizadas de átomos de carbono, com boas propriedades eletrônicas, elevada resistência mecânica e com ótimas propriedades químicas. De ponto de vista estrutural, há dois tipos de CNTs que a maioria dos métodos de síntese produz: os nanotubos de carbono de parede simples e de parede múltipla. Tal como o nome indica, os CNT de parede simples apresentam uma única folha de carbonos enrolada entre si para formar um tubo cilíndrico, já os CNTs de parede múltipla compreende um conjunto de 3 ou mais nanotubos concêntricos enrolados entre si (figura 1.19). No entanto, outros tipos de CNTs podem ser sintetizados, como CNT de paredes duplas ou em forma de cone (*cup-stack*). Estas diferenças nas estruturas devem-se a variações das condições de síntese.

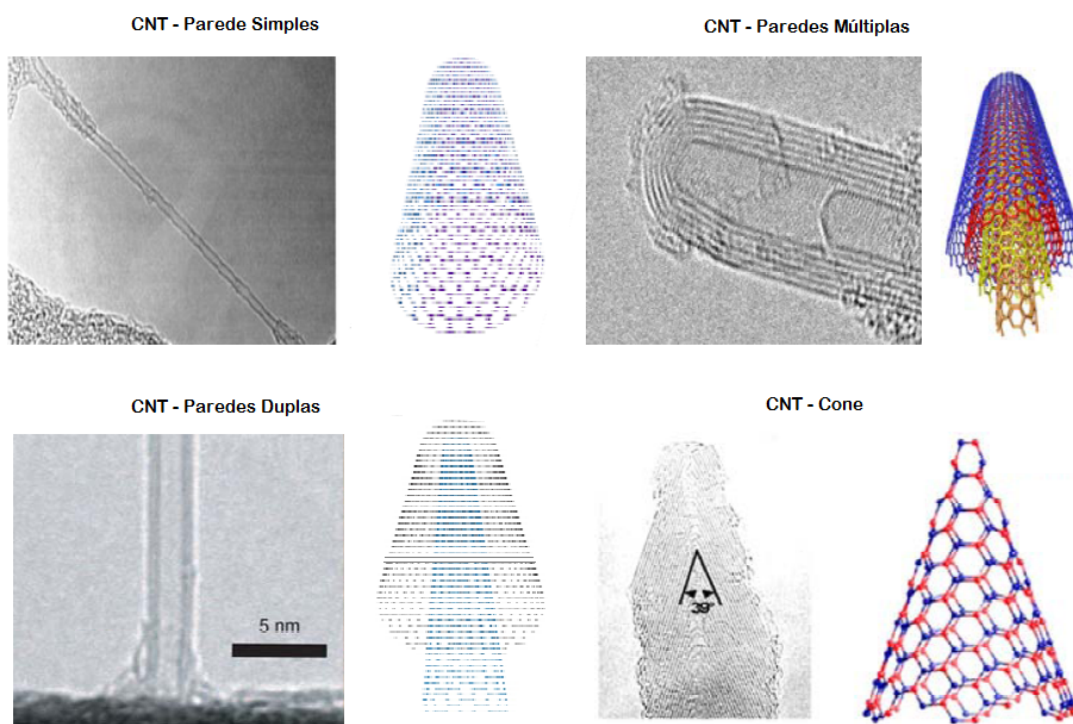


Fig. 1.19: Diagrama e microscopias dos diferentes tipos dos Nanotubos de Carbono, adaptado de [76].

Manisankar *et al.* efetuaram uma eletropolimerização da polianilina e do polipirrol com CNTs de paredes múltiplas [79]. Um GCE foi coberto com os nanotubos e posteriormente polimerizada a superfície, já alterada. Este desenvolvimento foi aplicado para a detecção de alguns pesticidas como a isoproturão e o dicofol.

Outro exemplo, recorrendo a um tipo de eléctrodo diferente, é descrito no

trabalho de Zhang et al. [80]: usam um elétrodo de ouro com uma camada auto-organizada de cistamina. Aplicaram-se CNTs de paredes múltiplas e ainda nanopartículas de ouro. Este MIP, bastante complexo, permitiu a detecção de salsolinol e ácido úrico em amostras de urina.

Como se percebe neste último trabalho, não só o CNTs são usados, mas as nanopartículas (NPs) são também um alvo bastante promissor na comunidade científica.

Como já foi referido, as NPs são estruturas de tamanhos reduzidos, também numa escala de dezenas de nanómetros e são bastante aplicadas em diferentes estudos devido às suas características óticas, às características eletrónicas e magnéticas [81].

Para além destas características, DelCarlo *et al.* [82] apontam ainda elevada importância para as propriedades técnicas e catalíticas que as NPs apresentam. Defende ainda as potencialidades de aplicações nas áreas de física, química, biologia e medicina.

A funcionalização de nanopartículas com bioreceptores, *quantum dots*, biomarcadores de forma a adaptá-las às mais diversas aplicações e finalidades, aumentando as potencialidades dos biossensores são uma realidade [83].

Kim *et al.*[84] apresentaram um estudo com NPs de ferro e enaltecem a potencialidade destas nanopartículas em aplicações biomédicas como na aquisição de imagens de ressonância magnética, em fármacos com cargas magnéticas e na reparação de tecidos.

Sperling *et al.*[85] utilizaram nanopartículas de ouro e demonstram que estas possuem uma maior estabilidade, uma maior compatibilidade biológica e uma maior facilidade de funcionalização.

O grafeno é outro nanomaterial bastante utilizado nas mais recentes investigações. Nestes últimos anos surgiu um interesse enorme na percepção das suas verdadeiras potencialidades e nas propriedades que realmente apresenta: desde propriedades mecânicas excelentes, propriedades de condutividade fantásticas, surge ainda o efeito de aumento de área de uma superfície. Esta é a razão principal para que seja o grafeno, o nanomaterial utilizado neste estudo. De seguida serão descritas, com pormenor, todas as características e capacidades do grafeno.

1.7.4 Grafeno

Uma importante propriedade do óxido de grafeno (GO), provocada pela natureza hidrofílica das camadas de grafeno oxigenadas, é a sua fácil esfoliação em meios aquosos. Como resultado, o grafeno apresenta estáveis suspensões coloidais em

camadas em água [86],[87], [88].

Apesar do grafeno ter sido isolado pela primeira vez no início dos anos 60 [89], nos últimos anos existiu um maior interesse neste novo membro da família do carbono [90], o que veio a torná-lo num dos materiais mais intensamente estudados [91],[92].

O grafeno é apresentado como uma monocamada planar com átomos de carbono, o que lhe confere uma estrutura bidimensional fortemente resistente. As ligações de carbono-carbono têm um comprimento de 0,142 nm, estrutura esta representada na figura 1.20. Este composto possui boas e importantes características para diversas aplicações devido à rápida capacidade de transmissão de elétrons à temperatura ambiente que varia de 120 000 para 250 000 $\text{cm}^2 \cdot (\text{Vs})^{-1}$, à elevada área, às suas propriedades mecânicas e a uma excelente condutividade térmica [93], [94], [95].

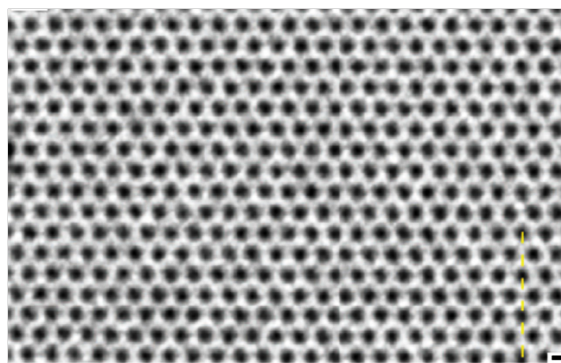


Fig. 1.20: Microscopia de transmissão de elétrons: membrana de grafeno com 1 Å de resolução e voltagem de aceleração de 80 kV [94].

As potencialidades deste composto conferem-lhe um grande interesse na investigação eletroquímica como na deteção de gases, no armazenamento de energia, na preparação de eléctrodos e de compósitos, sensores, transístores, células de energia, entre outros [96], [97], [98], [99], [100].

A falta de grupos funcionais torna o grafeno quimicamente compatível com todos os compostos. Para além disso, a funcionalidade pode ser introduzida quimicamente atribuindo-se uma reatividade específica [101].

A preparação de grafeno é um processo trabalhoso. Muitos métodos têm sido relatados como, por exemplo, protocolos de síntese orgânica [102], irradiação de feixe de elétrons [103] e reações de esfoliação [104]. A mais simples é a redução do óxido de grafeno [105]. O processo de oxidação é representado na figura 1.21.

O óxido de grafeno é a forma mais oxidada do grafeno que contém grupos polares orgânicos, como ácido carboxílico, fenol e aldeído [106]. Este óxido de

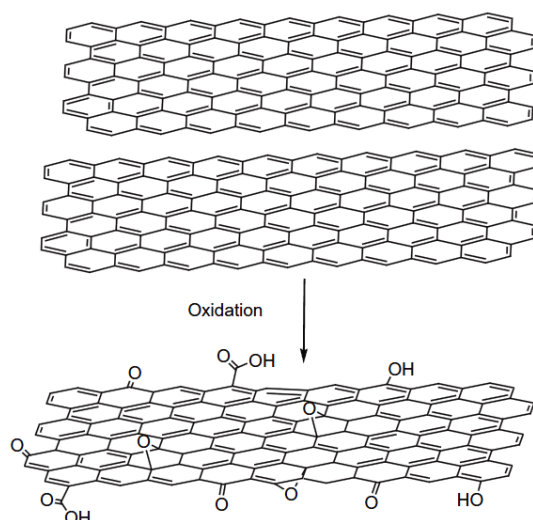


Fig. 1.21: Processo de oxidação da grafite para óxido de grafeno [94].

grafeno é hidrofílico para que possa ser facilmente disperso em soluções aquosas [101].

O óxido de grafeno apresenta-se como não condutor. Mediante a necessidade de se reduzir a grafeno, vários métodos estão já estabelecidos, tais como redução térmica, redução enzimática, utilização de hidrazina ou dimetilhidrazina a partir de suspensões aquosas [107], [108].

A aplicação do grafeno pode ser realizada em diferentes estados de oxidação, em aplicações diretas ou em compósitos.

A aplicação de compósitos de polímero e grafeno tem sido amplamente investigada e aplicada na área aeroespacial, automóvel, eletrónica e energia verde.

Alguns polímeros têm sido utilizados como compósitos de polímero-óxido de grafeno, tais como a polianilina, poli (metacrilato de metilo), poli (acrilonitrilo) e polipirrole [95], [109].

Como refere C. Zhu *et al.* [109], até à data têm sido feitos grandes esforços para desenvolver nanomateriais baseados em óxido de grafeno, para aplicações em biossensores, eletrónica e optoelectrónica, fotocatalizadores [110] e na imobilização de enzimas [109], [111].

1.8 Organização da dissertação

O presente trabalho está organizado da seguinte forma:

No capítulo 1, designado por Introdução, foi feita uma abordagem mais teórica com o objetivo de contextualizar o trabalho desenvolvido.

No Capítulo 2, descrevem-se os materiais e métodos desenvolvidos neste trabalho, desde a preparação dos elétrodos, à preparação de grafeno e construção

do sensor.

No Capítulo 3, apresentam-se todos os resultados obtidos com os sensores desenvolvidos e comparam-se os resultados com os descritos na literatura. Os sensores foram usados para a deteção dos fármacos em amostras reais de urina.

Finalmente, no Capítulo 4 resumem-se as principais conclusões que podem ser retiradas do trabalho desenvolvido.

Tab. 1.1: Métodos usados na detecção da Norfloxacina (NFX)

| Técnica | LOD | LOQ | Referência |
|--|-----------------------------|-----------------------------|------------|
| Eleetroforese Capilar + Eleetroquimiluminescência | 4,8x10 ⁻⁷ mol/L | | [14] |
| Eleetroforese Capilar + UV ¹ | 0,1 mg/mL | 0,33 mg/mL | [15] |
| HPLC ² + Espetrofotometria | 7,95x10 ⁻⁶ mol/L | 2,75x10 ⁻⁶ mol/L | [16] |
| Eleetroforese Capilar + eleetroquimiluminescência | 2,9x10 ⁻¹⁰ mol/L | 6,0x10 ⁻⁸ mol/L | [17] |
| Eleetroquímica - Polimetil | 1x10 ⁻⁷ mol/L | | [18] |
| HPLC ² | 15 ng/mL | 30 ng/mL | [19] |
| ELISA | 0,04 ng/mL | | [20] |
| Espetrofotometria | 1,7 nM | | [21] |
| Eleetroquímica - GCE ³ - SWV ⁴ + CV ⁵ | 1,1 ng/mL | | [22] |
| Amperometria + HPLC ² | 4,0 umol/L | 1,3x10 ⁻⁵ mol/L | [23] |
| Espetrofotometria | 0,04 ng/ml | | [2] |
| Eleetroquímica - grafite | 28x10 ⁻⁸ mol/L | | [24] |

¹UV-Ultravioleta;

²HPLC-Cromatografia Líquida;

³GCE-Elétrodo de carbono vítreo;

⁴SWV-Voltametria de onda quadrada;

⁵CV-Voltametria Cíclica;

Tab. 1.2: Métodos usados na detecção do Trimetoprim (TMP)

| Técnica | Observações | LOD | Referência |
|---|--|-----------------------------|------------|
| Eletroquímica | Elétrodo de Platina - CV ¹ | | [27] |
| Quemiluminescência | MIP - Polímero Molecularmente Impresso | 2×10^{-8} g/ml | [28] |
| Eletroquímica + Cromatografia Líquida | | 2×10^{-7} M | [29] |
| Cromatografia + Espectrofotometria de Massa | | 10 μ g/Kg | [30] |
| Eletroquímica | Potenciometria - MIP | $4,01 \times 10^{-7}$ mol/l | [6] |
| Eletroquímica | GCE ² | 3×10^{-9} M | [6] |
| Eletroquímica | GCE-porfirina+metal | 3×10^{-9} M | [31] |
| Cromatografia Líquida | MIP | 0,1 nmol/l | [32] |
| HPLC ³ + UV ⁴ | 0,05 ng/ml | | [33] |
| Eletroforese de Capilares | | 1,1 <i>muup</i> g/l | [34] |

¹CV-Voltametria cíclica;

²GCE-Elétrodo carbono vítreo;

³HPLC-Cromatografia líquida;

⁴UV-Ultravioleta;

Tab. 1.3: Exemplos de MIPs que utilizaram o pirrol como monômero funcional

| Análito | Técnica/Eletrodo | Eletropolimerização | LOD | Solução do MIP | Referência |
|------------------|-----------------------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------|
| D-Fructose | Potenciometria/GCE ¹ | -0,1 a 1,0V | | T. Fosfato e Fluoreto de Sódio | [72] |
| Nucleótidos | Potenciometria/Au ² | -0,1 a 1,0 V | | Cloreto de Zinco | [73] |
| Glucose | Potenciometria | Oxidação Química | | Tampão Fosfato | [57] |
| Enzima Citocromo | CV ³ /Pt ⁴ | -0,2 a 0,7 V | | Tampão Fosfato | [74] |
| Neomicina | SPR ⁵ /Au ² | -0,35 a 0,85 V | 2,0 pM | Tampão HEPES | [75] |
| Sulfametoxazol | CV ³ /PGE ⁶ | -0,6 a 1,40 V | 3,59x10 ⁻⁴ mol/L | Acetonitrilo e Água | [57] |

¹GCE-Eletrodo de Carbono Vítreo;

²Au-Eletrodo de Ouro;

³CV-Voltametria Cíclica;

⁴Pt-Eletrodo de Platina;

⁵SPR-Ressonância de plasma de superfície.

Parte Experimental

2.1 Reagentes e Soluções

Solução de alumina (Al_2O_3) 0,3 μ m (Buehler) e 0,05 μ m (Buehler); ácido sulfúrico 96% (Panreac); peróxido de hidrogénio 30% (Panreac); ácido clorídrico 30% (Fluka); hexacianoferrato (III) de potássio (Riedel-de-Haën); hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado (Riedel-de-Haën); dihidrogenofosfato de potássio (Riedel-de Haën); hidrogenofosfato de di-potássio (Riedel-de Haën); hidróxido de sódio (Panreac); cloreto de potássio (Pronalab); pyrrol 98% (Sigma-Aldrich); perclorato de Lítio (Sigma-Aldrich); acetonitrilo 99.8% (Merck); metanol 99,8% (Prolabo); permanganato de potássio (Sigma-Aldrich); peroxossulfato de potássio (Riedel-de- Haën); grafite (Merck); norfloxacin (Sigma-Aldrich); trimetoprim (Sigma-Aldrich); azoto 5,0 (grau de pureza 99.999%, LINDE, Portugal).

Foi preparada uma solução de H_2SO_4 a uma concentração de 0,5 mol/L para a limpeza eletroquímica dos elétrodos. A solução piranha utilizada numa limpeza mais profunda dos elétrodos foi preparada com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogénio numa proporção 3:1. A norfloxacin foi preparada numa solução de acetonitrilo e água, numa proporção de 85% e 15%, respetivamente, com uma concentração de 10^{-2} mol/L. O trimetoprim foi preparado também numa concentração 10^{-2} mol/L, dissolvido numa solução de NaCl, 0,1 mol/L, e metanol, numa proporção de 1 para 1. As soluções usadas para a leitura dos fármacos foram: ácido sulfúrico e cloreto de potássio, ambos a 0,1 M de concentração, para deteção do trimetoprim. A solução de hexacianoferrato (II) e hexaciano ferrato (III) de potássio tri-hidratado, usada da deteção da norfloxacin, foi preparada por diluição de uma massa rigorosa de cada suporte e acertado o pH a 7,4. A solução tampão de fosfato de pH 10 foi utilizada para sobreoxidar a camada do filme de polímero. As soluções de remoção utilizadas foram de NaOH 0,05 mol/L para o MIP da norfloxacin, e solução de NaOH a 0,1 mol/L e metanol, em igual

proporção, para a remoção do trimetoprim do MIP.

2.2 Equipamento

As determinações voltamétricas foram realizadas num potencióstato/ galvanóstato da marca AUTOLAB modelo PSTAT 12 com sistema de aquisição e tratamento de dados General Purpose Electrochemical System (GPES) versão 4.9, como se pode observar na figura 2.1.

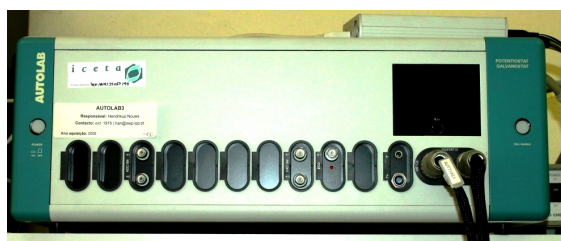


Fig. 2.1: Autolab utilizado.

No decorrer deste trabalho, foi usado um sistema de três elétrodos. Como elétrodo de referência usou-se o de Ag/AgCl, o elétrodo auxiliar de platina e elétrodo de carbono vítreo como elétrodo de trabalho com 3mm de diâmetro (BASI MF-2012), como se visualiza na figura 2.2.

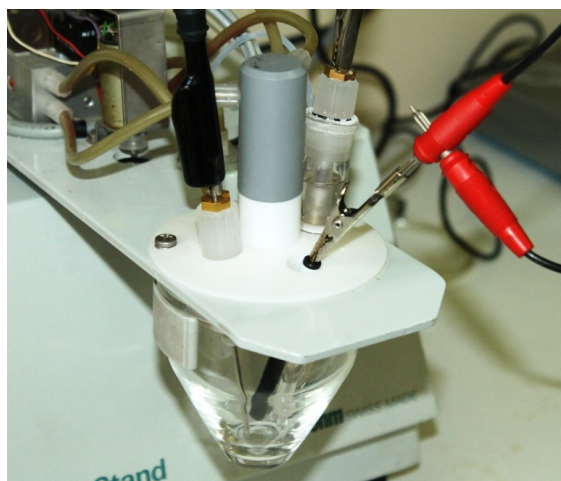


Fig. 2.2: Célula eletroquímica contendo os três elétrodos: trabalho, referência e auxiliar.

As medições de pH foram realizadas num pHmetro (GLP 22, Crison), com um elétrodo de vidro combinado da mesma marca.

A água pura foi obtida a partir do sistema de purificação de modelo Elix da Millipore. Apenas para a preparação de soluções foi utilizada água obtida de um sistema de ultrapurificação de água Millipore Simplicity 185 (Resistividade=18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25°C).

Para medição de volumes foram utilizadas micropipetas Gilson Medical Electronics (pipetman®) de 20µl, 10µl, 200µl, 100µl e 5000µl.

As pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo), com precisão de 0,00001 g.

Na limpeza dos elétrodos foi utilizado um banho de ultra-sons (Crest). Para auxílio na dissolução das preparações foi utilizado o equipamento de ultras-sons (Sonorez Digital 10P Bandelin).

O tecido de polimento utilizado como base de fricção para limpar os elétrodos (Buehler MicroCloth) é feito de fibras sintéticas (Rayon). Para a preparação de grafeno recorreu-se à centrífugadora da Sigma (Sartorius).

2.3 Procedimentos

Nesta secção serão descritos os procedimentos usados para a execução do trabalho. A limpeza dos elétrodos é um trabalho importante para que os resultados sejam os mais exatos e reprodutíveis possíveis. A preparação do grafeno foi desenvolvida segundo um protocolo já referenciado como se poderá verificar. A preparação dos polímeros na superfície dos elétrodos e a preparação das amostras biológicas são alguns dos protocolos que se podem encontrar de seguida.

2.3.1 Limpeza de Elétrodos

O pré-tratamento dos elétrodos de carbono vítreo consistiu numa limpeza mecânica seguida de uma oxidação química e de um tratamento eletroquímico. Este último serviu para garantir a eficiência da limpeza.

O procedimento de pré-tratamento mecânico consistiu no polimento manual dos elétrodos de carbono com solução de alumina diluída, utilizando tecido de polimento como base para fricção.

Inicialmente utilizou-se uma solução de alumina 0,3µm e posteriormente uma solução de alumina 0,05µm. A cada troca de granulometria os elétrodos eram lavados com água ultra pura. O polimento foi efetuado até que as superfícies apresentassem um aspeto espelhado. Posteriormente, os elétrodos eram enxaguados em água ultrapura e levados ao ultrassom durante 5 minutos para a remoção de partículas residuais de alumina da superfície do eléctrodo.

A oxidação química de possíveis contaminantes adsorvidos foi realizada por imersão dos elétrodos numa solução piranha numa proporção de 1:3 (V/V) de H_2O_2 e H_2SO_4 respetivamente, durante 3-4 minutos. Esta solução, fortemente oxidante, foi sempre utilizada imediatamente após ter sido preparada. Posteriormente, os elétrodos eram lavados, exaustivamente, em água ultrapura.

A etapa da limpeza eletroquímica efetuou-se através da voltametria cíclica variando o potencial de -0,2 V a +1,6 V (vs. Ag/AgCl) em solução aquosa de H_2SO_4 0,5 mol/L e variando à velocidade de varrimento de 0,050 V/s executando 25 ciclos.

2.3.2 Síntese de Grafeno

O grafeno foi preparado a partir de pó de grafite ultra puro seguindo os protocolos apresentados por Hummers e Offeman, e Kovtyukhova *et al.* [112].

Foram utilizados 4 g de pó de grafite, o qual foi oxidado a 80°C numa solução de ácido sulfúrico concentrado (24 mL), perodissulfato de potássio (8 g) e pentóxido de fósforo (8 g). A mistura foi arrefecida lentamente até à temperatura ambiente e mantida mais de 10 h, tendo resultado numa mistura azul. De seguida a mistura foi centrifugada e diluída em 300 mL de água destilada. Este procedimento foi repetido três vezes, rejeitando as impurezas sobrenadantes.

Posteriormente adicionaram-se 460 mL de ácido sulfúrico e a mistura foi mantida sob agitação a uma temperatura inferior aos 20°C enquanto se adicionou lentamente o permanganato de potássio (60 g) em constante agitação.

Durante 2h agitou-se a solução onde foi adicionada água destilada (920 mL), nitrato de sódio (2 g) e a mesma foi mantida a uma temperatura nunca superior aos 30°C. Para purificação do grafeno foi adicionada a solução de ácido clorídrico e peróxido de hidrogénio numa proporção 3:9 (10 mL).

Formou-se uma coloração castanha. A solução foi centrifugada inúmeras vezes, a 3000 rpm, em intervalos de 20 minutos, rejeitando o sobrenadante, adicionando água pura, até atingir o valor de pH 7.

O grafeno foi caracterizado por microscopia de transmissão eletrónica.

2.3.3 Preparação de Polímero Molecularmente Impresso para Trimetoprim - MIP

Como referido anteriormente o eléctrodo utilizado foi o eléctrodo de carbono vítreo. Após o pré-tratamento procedeu-se à modificação da superfície com o polímero pirrol.

Para a preparação do MIP usou-se uma mistura do fármaco, do monómero (unidade básica do polímero pirrol) para se efectuar a polimerização, do eléctrolito de suporte de perclorato de lítio e das soluções usadas na preparação do MIP para o TMP.

Na tabela 2.1 encontram-se indicadas as concentrações das soluções usadas na preparação do MIP do TMP depois de otimizadas.

Tab. 2.1: Composição da solução usada para a preparação do MIP para TMP

| Composição da Solução | |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Pirrol | 50 mmol/L |
| Perclorato de Lítio | 50 mmol/L |
| 50% Hidróxido de Sódio + 50% Metanol | 0,1 mol/L |
| TMP | $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L |

Para a remoção do oxigénio da solução fez-se borbulhar gás inerte, azoto, durante 10 minutos na solução. As condições de polimerização apresentam-se na tabela 2.2.

Tab. 2.2: Condições de polimerização para construção do MIP para TMP

| Condições de Polimerização | |
|-----------------------------------|--------------|
| Intervalo de Potencial | 0 - +1,0 (V) |
| Velocidade de Varrimento | 0,1 (V/s) |
| Número de ciclos | 10 ciclos |

Assim, a polimerização do pirrol foi realizada por aplicação de voltametria cíclica numa faixa de potencial entre os 0 a +1,0 V vs AgCl/Ag. O varrimento de potencial foi aplicado a uma velocidade de +0,1 V/s durante 10 ciclos.

2.3.4 Preparação de Polímero Não Molecularmente Impresso para TMP - NIP

O polímero não molecularmente impresso - NIP - distingue-se do MIP pela inexistência do fármaco na solução de polimerização.

Todas as condições da preparação da solução de polimerização do pirrol foram mantidas, à exceção do fármaco que foi retirado da mistura, como se pode verificar por comparação das tabelas 2.1 e 2.3.

Tab. 2.3: Composição da solução usada para a preparação do NIP para TMP

| composição de Solução | |
|--------------------------------------|-----------|
| pirrol | 50 mmol/L |
| Perclorato de Lítio | 50 mmol/L |
| 50% Hidróxido de Sódio + 50% Metanol | 0,1 mol/L |

Na preparação do NIP, seguiu-se o procedimento desenvolvido na preparação do MIP, na ausência do TMP. As concentrações mantiveram-se iguais, 50 mmol/L

de polímero e do eletrolítico suporte, perclorato de lítio, 50 mmol/L. Usou-se também uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L em solução mistura de água e metanol (50:50) como no caso do MIP. O azoto foi mantido durante 10 minutos antes da polimerização, borbulhando na solução.

As condições de polimerização, ou seja, a gama de potenciais aplicada, a velocidade de varrimento e o número de ciclos foram mantidos como na preparação do MIP, como é referido na tabela 2.2.

2.3.5 Preparação de Sobreoxidação para MIP e NIP da TMP

Após a polimerização foi aplicada uma sobreoxidação. As condições usadas na sobreoxidação do polímero estão registadas na tabela 2.4.

O eléctrodo, depois de sofrer a polimerização, com o polímero pirrol e o fármaco à superfície, era mergulhado numa solução de tampão fosfato 0,1 mol/L. O pH da solução foi ajustado a 10, valor otimizado. Foram usadas as mesmas condições de polimerização eletroquímica, que no caso em que se preparam os MIPs por voltametria cíclica.

Tab. 2.4: Composição da solução eletrolítica e condições usadas na preparação do MIP/NIP para o TMP com sobreoxidação

| Composição da Solução Eletrolítica | |
|---|--------------|
| Solução de tampão fosfato - pH 10 | 0,1 mol/L |
| Polimerização | |
| Intervalo de Potencial | 0 - +1.0 (V) |
| Velocidade de Varrimento | 0,1 (V/s) |
| Número de ciclos | 10 ciclos |

2.3.6 Metodo Direto para Deteção de TMP

Aplicação do grafeno:

Foram preparadas diferentes soluções de grafeno em endorfes. 1 mg de grafeno foi diluído em 1 mL de água ultra pura. Esta solução foi centrifugada 5 vezes, rejeitando o sobrenadante para eliminar algumas impurezas ainda existentes. Foram aplicados 30µl, em forma de gota, desta última solução sobre a superfície do eléctrodo limpo. Levou-se o eléctrodo à estufa durante 5 minutos, a uma temperatura de 50 °C para secar. Manteve-se o eléctrodo na posição horizontal para garantir uma distribuição homogénea do grafeno na superfície do eléctrodo.

Polimerização e Sobreoxidação:

De seguida efetuou-se a polimerização sobre diferentes elétrodos para o MIP e NIP de acordo com o procedimento anteriormente descrito. Aplicou-se a sobre-oxidação nas mesmas condições enunciadas anteriormente.

Método Direto:

Para a determinação do TMP utilizou-se o método direto. Para isso colocou-se uma solução tampão, composta por 0,1 mol/L de H_2SO_4 e 0,1 mol/L KCl, na célula eletroquímica para se efetuarem as medições.

O elétrodo era mergulhado numa solução de TMP num intervalo de concentrações de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L, gama selecionada como a possível para a deteção pelo MIP. Esta imersão era realizada durante 30 minutos com um agitador magnético com uma velocidade de rotação em torno das 100 rpm, garantindo assim que a solução do fármaco se manteria homogénea em função do tempo. Depois disto, o elétrodo era cuidadosamente enxaguado com água ultrapura e colocado na célula eletroquímica para a medição. O sinal do pico do fármaco, ou seja, a intensidade da corrente de pico aumentava com a concentração do TMP.

Posteriormente, após a leitura, o MIP era colocado durante 30 minutos numa solução aquosa de NaOH 0,1 mol/L e metanol na proporção 50:50, com agitação, à semelhança do procedimento anterior. Depois, o elétrodo é novamente enxaguado com água ultrapura e colocado na célula eletroquímica para uma nova leitura. Neste momento deve garantir-se que não se observa um sinal, isto é, uma ausência do pico do fármaco que garante a remoção completa do fármaco ao MIP.

As leituras foram efetuadas por voltametria de onda quadrada com velocidade de +0,1 V/s, com uma amplitude de 0,199 A e com uma frequência de 25 Hz.

Aplicação em Amostra de Urina:

O sensor desenvolvido para a deteção do TMP foi usado para a sua determinação em amostras de urina. Para isso, foram recolhidas várias amostras de urina do mesmo indivíduo, em dias diferentes. A urina foi recolhida para frascos esterilizados para evitar contaminações.

As amostras foram sujeitas a uma centrifugação durante 30 minutos a 3000 rpm. Este procedimento permitiu eliminar alguns interferentes e precipitar as proteínas (precipitado branco).

O pH da urina não foi alterado visto que era aproximadamente 6,5.

Efetuaram-se adições de fármaco às amostras de urina. Prepararam-se concentrações rigorosas próximas de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} mol/L de TMP em urina.

As soluções de urina foram mantidas em frascos e os testes foram feitos até ao limite de 2 h após a colheita.

As medições nas amostras de urina respeitaram o procedimento descrito no ponto anterior, do método direto.

2.3.7 Preparação de Polímero Molecularmente Impresso para NFX - MIP

Para a preparação do MIP para a Norfloxacin (NFX), procedeu-se de modo semelhante ao do TMP. As condições experimentais foram otimizadas tendo-se selecionado os parâmetros encontrados para a construção do MIP do TMP.

Na tabela 2.5 encontram-se indicadas as concentrações das soluções utilizados.

Tab. 2.5: Composição da solução usada para a preparação do MIP para NFX

| Composição Solução | |
|-----------------------------|----------------------------|
| pirrol | 50 mmol/L |
| Perclorato de Lítio | 50 mmol/L |
| 85% Acetonitrilo + 15% Água | |
| NFX | $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L |

Fez-se borbulhar o azoto na solução durante 10 minutos para a remoção do oxigénio antes da polimerização.

Relativamente às condições de polimerização, elas estão registadas na tabela 2.6.

Tab. 2.6: Condições da polimerização para construção do MIP para NFX

| Condições de Polimerização | |
|------------------------------|--------------|
| Potencial de Condicionamento | +1,2 (V) |
| Duração | 90 s |
| Potencial | 0 - +1,0 (V) |
| Velocidade de Varrimento | 0.1 (V/s) |
| Número de ciclos | 10 ciclos |

Neste caso, foi necessário efetuar uma etapa de condicionamento por aplicação do potencial de +1,2 V durante 90 s, de forma a forçar a deposição da NFX na superfície do eletrodo. Para além desta polimerização eletroestática, foi efetuada uma eletropolimerização, por aplicação de voltametria cíclica numa faixa de potencial entre os 0 a +1,0 V vs AgCl/Ag. Os varrimentos ocorreram a uma velocidade de 0,1 V/s durante 10 ciclos, condições adequadas para a obtenção de uma polimerização ótima.

2.3.8 Preparação de Polímero Não Molecularmente Impresso para NFX - NIP

As condições da preparação da solução de polimerização foram mantidas relativamente às da preparação do MIP-NFX, à exceção da ausência da NFX.

Tab. 2.7: Composição da solução usada para a preparação do NIP da NFX

| Condições de Solução | |
|-----------------------------|-----------|
| pirrol | 50 mmol/L |
| Perclorato de Lítio | 50 mmol/L |
| 85% Acetonitrilo + 15% Água | |

No que se refere às condições de polimerização, mantêm-se as referidas na tabela 2.6. A aplicação de polimerização eletroestática seguida da polimerização eletroquímica foram igualmente aplicadas.

2.3.9 Preparação de sobreoxidação para MIP e NIP da NFX

Após a polimerização foi aplicada uma sobreoxidação.

As condições de preparação da solução, bem como as condições experimentais para a aplicação do MIP e NIP para NFX, estão apresentadas na tabela 2.8.

Tab. 2.8: Composição da solução eletrolítica e condições usadas na preparação do MIP/NIP para NFX com sobreoxidação

| Condições de Solução | |
|-----------------------------------|--------------|
| Solução de tampão fosfato - pH 10 | 0,1 mol/L |
| Condições de Polimerização | |
| Potencial | 0 - +1,2 (V) |
| Velocidade de Varrimento | 0,1 (V/s) |
| Número de ciclos | 10 ciclos |

O eléctrodo foi mergulhado numa solução de tampão fosfato 0,1 mol/L, com pH 10. A oxidação foi aplicada por voltametria cíclica durante 10 ciclos, com uma faixa de potencial mais alargada, de 0 a +1,2 V. A velocidade de varrimento foi de 0,1 V/s.

2.3.10 Metodo Indireto para Deteção de NFX

Polimerização e Sobreoxidação:

Efetuiu-se a polimerização do pirrol sobre a superfície de eletrodos de carbono vítreo para a preparação do MIP e NIP como anteriormente foi descrito. Aplicou-se a sobreoxidação nas mesmas condições enunciadas anteriormente.

Método Indireto:

Relativamente à NFX utilizou-se o método indireto como meio de detecção do fármaco por não ter sido possível atingir a sensibilidade pretendida com o método direto. Colocou-se uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{4-/3-}$ a 0,1 mmol/ na célula eletroquímica e registaram-se os voltamogramas cíclicos.

A remoção da NFX foi feita numa solução de 0,05 M de hidróxido de sódio (NaOH), durante 20 minutos, com uma agitação magnética constante de 100 rpm. A medição da intensidade da corrente de pico de $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{4-/3-}$ foi efetuada por voltametria de onda quadrada, com potencial de 0 a +1,3 V, com amplitude de 0,199 A e com uma frequência de 25 Hz. Depois de se efetuar a remoção lavou-se o MIP cuidadosamente com água ultrapura e mergulhou-se o eletrodo na célula eletroquímica. Como se trata de um método indireto, o que se mediu foi o sinal do $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{4-/3-}$ que era detetado por ocupação das cavidades do MIP. A intensidade de corrente de pico era elevada garantindo uma total remoção do fármaco das cavidades.

Aumentou-se o período de tempo para a incubação do fármaco. Estimou-se 30 minutos como duração ideal, com mantendo a agitação. O eletrodo com o MIP foi mergulhado em soluções de NFX na gama de concentrações entre $1,0 \times 10^{-2}$ até $1,0 \times 10^{-9}$ mol/L. O eletrodo foi novamente enxaguado com água e mergulhado na solução de $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{4-/3-}$ em tampão fosfato de pH 7,4 contida na célula eletroquímica. O sinal analítico obtido deveria ser nulo ou reduzido, significando a ocupação das cavidades por NFX, ou seja, impedindo a detecção do $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{4-/3-}$.

Resultados e Discussão

3.1 Pré-tratamento dos elétrodos

O pré-tratamento dos elétrodos é um trabalho fundamental na eletroquímica. A fiabilidade dos resultados, a reprodutibilidade e a probabilidade de obtenção de bons resultados depende primeiramente da preparação e estado dos elétrodos. Por isso, neste trabalho, foi aplicado um processo de limpeza aos elétrodos de carbono vítreo antes de cada teste.

O pré-tratamento consistiu num conjunto de mecanismos de limpeza para garantir uma boa performance de utilização. Começou-se por efetuar uma limpeza mecânica em movimentos de oito, sobre uma lixa de polimento em alumina de diferentes granulometrias como explicado nos procedimentos no capítulo anterior. De seguida procedeu-se a uma limpeza eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo numa solução de ácido sulfúrico 0,5 mol/L.

A forma do voltamograma em que não se regista qualquer pico no intervalo de potencial considerado comprova a qualidade da superfície do eletrodo [113] e [114]. A figura 3.1 representa o voltamograma resultante.

O eletrodo foi mergulhado na solução de ácido sulfúrico e aplicados 25 ciclos de varrimento usando voltametria cíclica. O potencial variou entre -0,2 V a +2,0 V. O valor do incremento de potencial na voltametria cíclica foi de 0,00198 V.

Uma limpeza insuficiente provoca o aparecimento de picos, o que indica a existência de alguns compostos ou moléculas ainda absorvidas ou aderidas na superfície do eletrodo. Quando isto acontece repete-se o processo de limpeza mecânica e eletroquímica, ou ainda, mergulha-se o eletrodo numa solução de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogénio, designada por solução piranha. Esta solução atua como oxidante forte. Estes procedimentos são executados repetidamente até se obter um voltamograma como o apresentado.

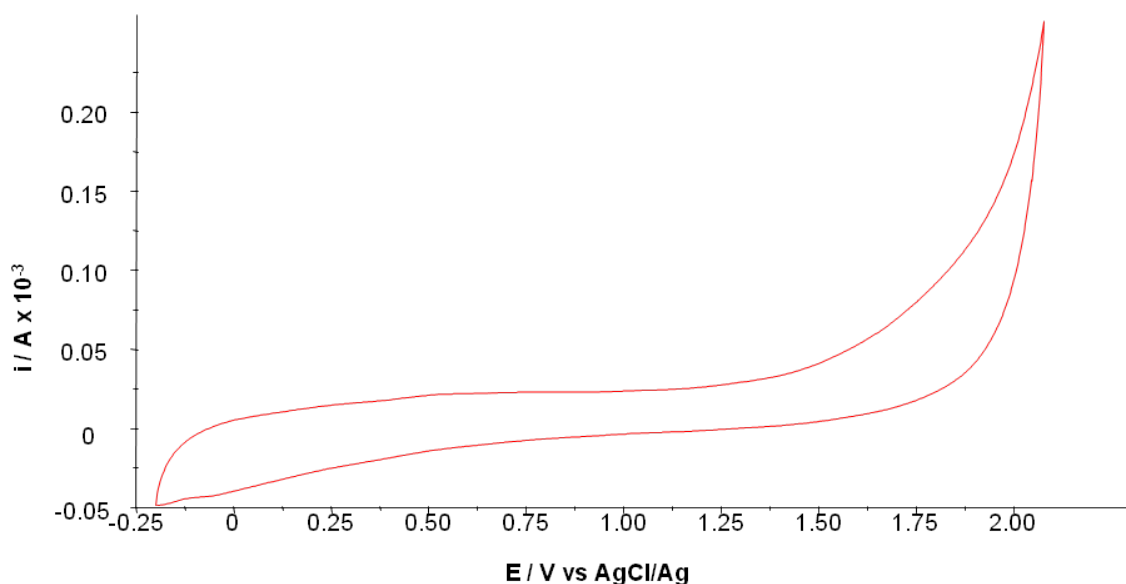


Fig. 3.1: Limpeza de eletrodos de carbono vítreo em solução de H_2SO_4 0,5 mol/L.

3.2 Eliminação de oxigénio da solução por aplicação de azoto

O azoto é um gás inerte comumente utilizado na eletroquímica por ser um gás barato e eficiente. A sua aplicabilidade deve-se à necessidade de remoção de oxigénio existente nas soluções, por ser um interferente a figura 3.2 ilustra um pico de oxidação do oxigénio a um potencial no intervalo dos +0,3 aos +0,5 V.

Fazendo borbulhar azoto durante 10 minutos na solução, o pico do oxigénio desaparece. Este pico é facilmente detetado por se encontrar em torno dos +0,3 e +0,5 V e por apresentar uma altura elevada e uma largura consideravelmente grande. Assim, de forma a evitar a interferência do oxigénio, este procedimento é repetido antes de todos os ensaios.

3.3 Grafeno

A monocamada bidimensional (2D) de átomos de carbono dispostos em retículo, atraiu recentemente grande interesse na área da investigação.

Como referido na subsecção 1.7.4, o grafeno é usado devido à sua estabilidade química, à excelente condutividade, à fácil funcionalização e à sua elevada área de superfície. Esta última característica é a principal razão de interesse para a sua preparação e aplicação neste trabalho. Conseguir aumentar a área de superfície do sensor significa aumentar a capacidade de deteção do fármaco, logo, aumentar a sua sensibilidade.

É bastante perceptível a esfoliação do grafeno, sendo este caracterizado por um

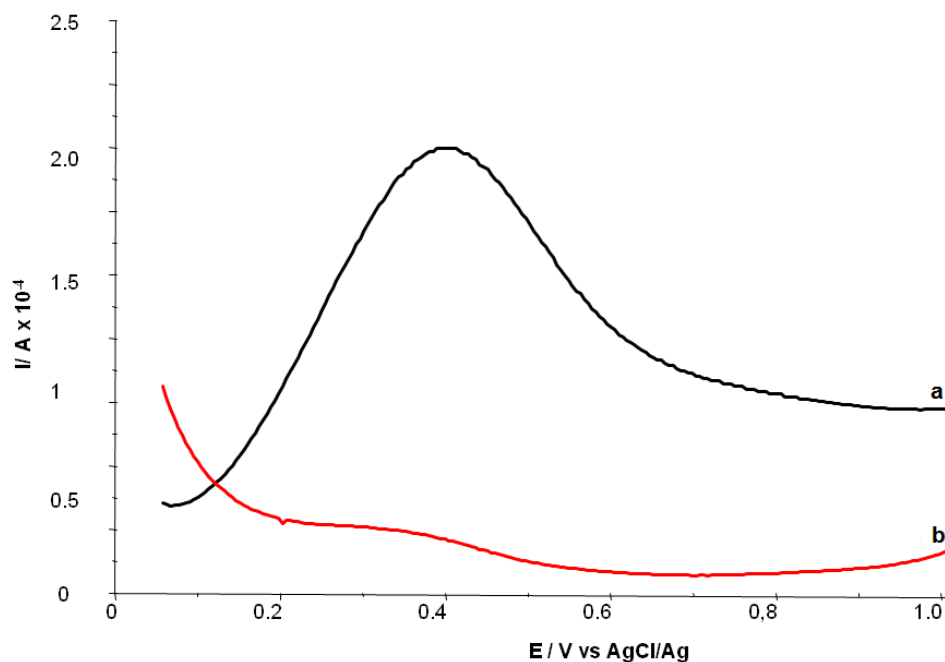


Fig. 3.2: Voltamograma de uma solução de eletrólito O_2 : a) presença de oxigênio; b) após fazer borbulhar N_2

conjunto de folhas associadas formando-se um sólido desordenado. As imagens da figura 3.3 confirmam o sucesso na preparação do grafeno [115]. Depois de rigorosamente seguido o protocolo apresentado no capítulo 2.3.2, as partículas do grafeno foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

Da imagem a) à imagem d) variam as ampliações e as posições da mesma solução do grafeno oxidado.

O grafeno oxidado foi aplicado no desenvolvimento do trabalho para amplificação do sinal da detecção. Foi colocada uma gota de grafeno anteriormente à polimerização do MIP e NIP para o TMP em eletrodo de carbono vítreo.

3.4 Trimetoprim

3.4.1 Preparação do MIP para o Trimetoprim

A polimerização do pirrol foi efetuada sobre a superfície do eletrodo de trabalho de carbono vítreo tratado de acordo com o descrito na parte experimental, seção 2.3.1. Na construção do MIP a polimerização foi efetuada na presença do fármaco TMP. O NIP foi preparado do mesmo modo mas na ausência do TMP.

Na figura 3.4 são apresentados os resultados da polimerização do MIP e do NIP para TMP, em que a técnica usada foi a voltametria cíclica.

Numa primeira análise consegue-se distinguir o voltamograma do MIP e do

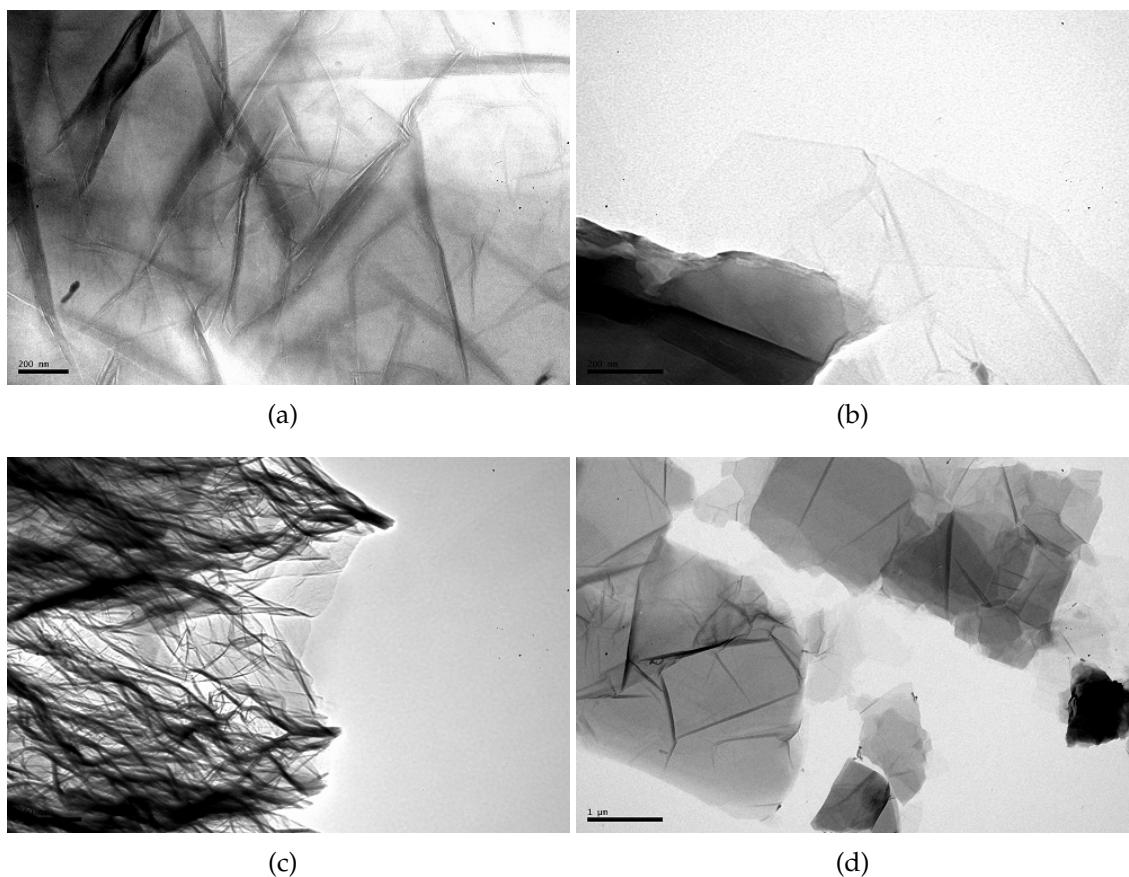


Fig. 3.3: Imagens TEM de grafeno sintetizado: (a) 200 nm; (b) 200 nm; (c) 100 nm e (d) 1 μ m.

NIP, pela forma que apresentam. Com o aumento do número e ciclos a quantidade de polímero que se forma à superfície do eletrodo de trabalho vai aumentando. O mesmo acontece com a quantidade de fármaco que se vai incorporando ao pirrol e vai engrossando a cadeia polimérica.

Durante a polimerização, consegue observar-se um aumento de espessura em toda a gama de potenciais. Isto indica uma boa polimerização [116] e [117]. Tal como os autores referenciados, em cada ciclo vão sendo depositadas camadas de polímero e a largura do voltamograma vai aumentando.

Na figura 3.4, a) isso acontece de forma notória. Relativamente a b), que se refere à polimerização do NIP, a largura do voltamograma não aumenta tão acentuadamente. Isto deve-se à ausência do fármaco. Embora se verifique um aumento da espessura de ciclo para ciclo, essa diferença é muito pequena.

Esta característica da espessura, é verdadeiramente importante e está relacionada com o número de ciclos efetuados por voltametria cíclica. Neste trabalho, no processo de polimerização só foram realizados 10 ciclos. Este número foi otimizado: quantos mais ciclos se aplicavam maior era o número de moléculas de fármaco que ficavam encrustadas no polímero e mais difícil se tornava a

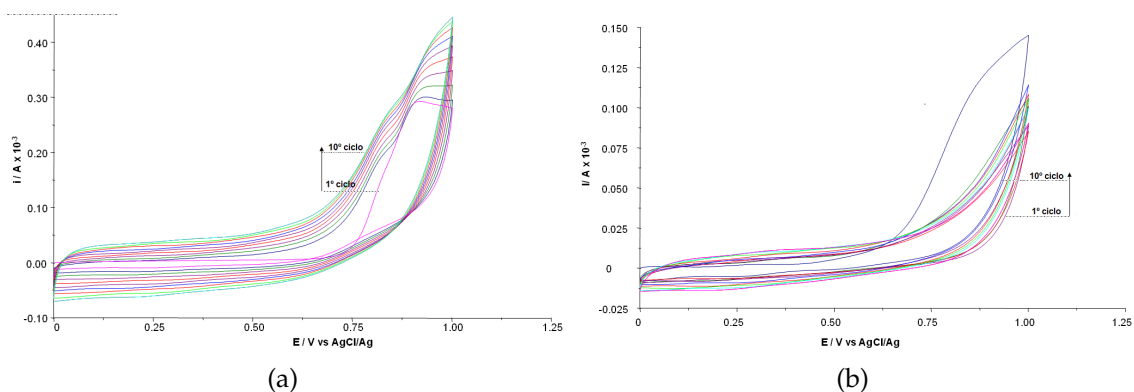


Fig. 3.4: Voltamogramas de polimerização correspondentes a: (a) MIP e (b) NIP.

remoção o fármaco. Para além disso, se a espessura for excessiva contribui para que o polímero se solte da superfície do eletrodo e caia na solução por gravidade. Fixando 10 ciclos no passo de polimerização, otimizou-se a composição das soluções da remoção do TMP e a da deteção do TMP.

O intervalo de potencial aplicado foi dos 0 aos +1,0 V confirmando os resultados obtidos por Haddad et al. [116]. O potencial de pico de oxidação para o TMP é próximo de 1,0 V [118]. A velocidade de varrimento foi otimizada e o valor escolhido foi de 100 mV/s; o incremento de potencial selecionado foi de 0,00198 V.

Estas condições de polimerização foram usadas na preparação dos MIPs e NIPs do TMP.

3.4.2 Sobreoxidação do MIP e NIP

A sobreoxidação é aplicada sobre o MIP e sobre o NIP para estabilizar o polímero, melhorar a qualidade do sinal analítico e consequentemente a sensibilidade do sensor. Assim, nas mesmas condições experimentais de polimerização descritas anteriormente, para proceder à sobreoxidação, o eletrodo com o MIP e NIP na superfície é colocado na célula eletroquímica numa solução tampão fosfato (PBS) de pH 10 e são efetuados 10 ciclos.

A sobreoxidação é um processo bastante importante para conferir estabilidade ao polímero. O que acontece quando não se aplica esta oxidação, é que o polímero adere menos à superfície do eletrodo e tende a soltar-se. Acaba por deteriorar-se com o uso, com as aplicações e com o mergulhar sucessivamente em diferentes soluções. Estes resultados estão de acordo com Wen et al. No estudo são apresentados voltamogramas de oxidação com 60 ciclos para atingirem a estabilidade máxima [119].

O que se pode verificar na figura 3.5 é que os voltamogramas são bastante semelhantes ao do autor anteriormente referido. Isto deve-se à reação de oxidação

que acontece em toda a superfície do pirrol.

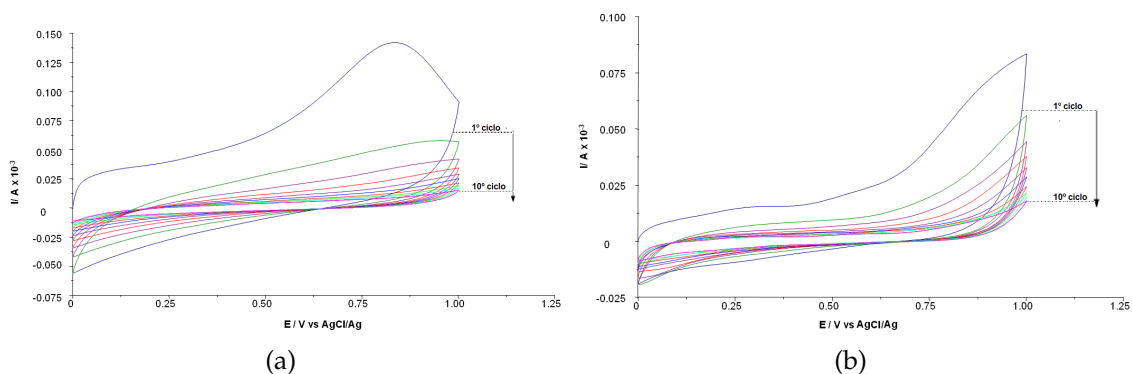


Fig. 3.5: Perfis de sobreoxidação: (a) MIP e (b) NIP.

Ao invés da polimerização, na sobreoxidação a espessura dos voltamogramas diminui. Ciclo a ciclo, o voltamograma deve estreitar, o que indica uma eficiência do processo.

É ainda importante realçar que este processo reduz a corrente capacitiva. Este é um passo importante na preparação de um sensor que nunca deve ser esquecido para a obtenção de resultados precisos e exatos.

3.4.3 Aplicação de Grafeno

Na tentativa de melhorar a performance do MIP e NIP preparados de acordo com o procedimento descrito, aplicou-se grafeno sobre a superfície do polímero.

O aumento da condutividade, o aumento da estabilidade e o aumento da área de superfícies são algumas das razões desta opção.

Assim na figura 3.6 comparam-se dois voltamogramas traçados nas mesmas condições para o TMP com o MIP sem (a) e com (b) grafeno.

A aplicação de grafeno reflete algumas diferenças estruturais na superfície do eletrodo, e conseqüentemente nos resultados obtidos. O pico de oxidação do TMP aumenta significativamente com a deposição do grafeno. Isto pode ser observado na figura 3.6. No voltamograma (a) consegue-se observar apenas um ligeiro aumento de intensidade de corrente que traduz a presença de TMP mas com sensibilidade muito reduzida. Os voltamogramas registados na figura 3.6 são obtidos com os MIPs seguidos de sobreoxidação. O fármaco está oxidado e por isso o pico é mais pequeno. Esta situação é intencional para que se possa verificar que realmente o grafeno consegue aumentar o sinal analítico. Mais à frente serão apresentados mais resultados por aplicação do grafeno.

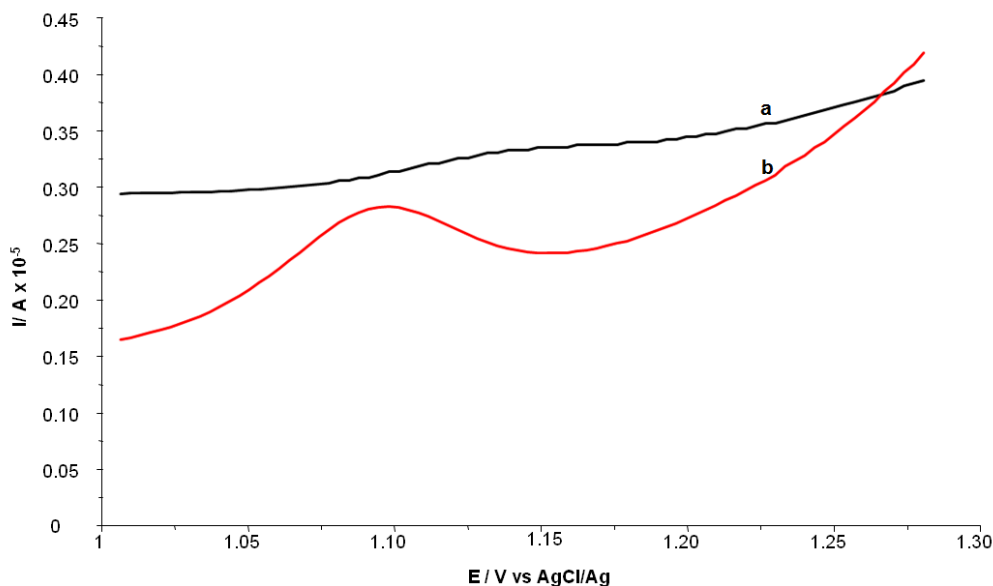


Fig. 3.6: Comparação de um MIP sem (a) e com (b) grafeno.

3.4.4 Detecção de Trimetoprim

A deteção da TMP é um dos principais objetivos para a preparação deste sensor. Depois de se prepararem os MIPs pretende-se que eles funcionem de forma seletiva: consigam identificar o pico do TMP e não registem qualquer sinal na ausência de TMP.

Depois de se preparar o MIP e o NIP é necessário validá-los. Para isso, otimizou-se o solvente capaz de remover o TMP do polímero formado na superfície do eletrodo de trabalho. Foram testadas diferentes soluções, a diferentes pH's. Para que os resultados possam ser comparados, ambos os eletrodos do MIP e NIP foram mergulhados em diversos solventes durante um intervalo de tempo. Após este passo os eletrodos eram colocados numa solução de eletrólito e traçados os voltamogramas. Os voltamogramas sem pico de oxidação do fármaco, comumente designados como brancos, servem como termo de comparação.

Os sensores foram imergidos numa solução de TMP com concentração de 0,01 mol/L e os voltamogramas traçados de seguida. Os voltamogramas obtidos estão representados na figura 3.7

Os resultados provam o sucesso da preparação do MIP. A deteção do fármaco é possível pois observa-se um pico em torno de 1,1 V. Quando se aplica a solução para remoção de TMP, o voltamograma comprova que nada existe na superfície do eletrodo, pois no voltamograma não surge nenhum pico.

Quando se repetem os ensaios nas mesmas condições com o NIP, não existem cavidades para deteção do fármaco. Contudo, o voltamograma apresenta um pico cuja intensidade de corrente é muito pequena ao potencial característico do TMP. Tal deve-se ao facto de algumas moléculas de TMP poderem ter ficado adsorvidas à

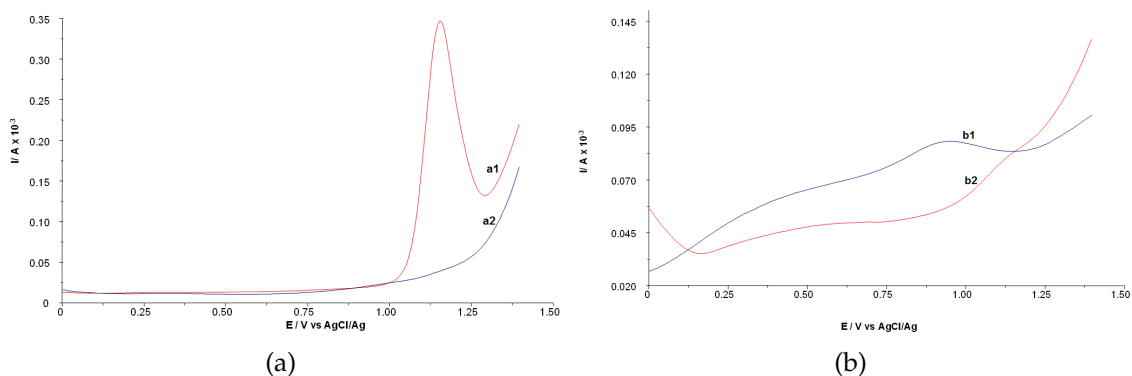


Fig. 3.7: Detecção de TMP com: (a) MIP e (b) NIP.

superfície de polímero.

O princípio então para o funcionamento dos sensores MIPs é a ocupação de cavidades pelas moléculas do fármaco. Quando o MIP com o fármaco é colocado na solução de remoção, metanol e hidróxido de sódio, numa proporção 50-50, o TMP é dissolvido e as cavidades são libertadas. Os elétrodos foram colocados nesta solução de remoção durante 30 minutos, tempo suficiente para uma remoção eficiente.

Para incubar, ou seja, para que o fármaco adira ao polímero e ocupe as cavidades no sensor e o sensor detete a TMP em solução, o sensor é mergulhado numa solução de concentração 0,01 mol/L de TMP durante 30 minutos. Este é o tempo ótimo para a incubação do fármaco.

O elétrodo é transportado para a célula eletroquímica e mergulhado numa solução de ácido sulfúrico e cloreto de potássio. A medição é feita por voltametria de onda quadrada, a uma frequência de 0,199 MHz e amplitude de 0,199 A. O intervalo de potencial aplicado foi de 0 a +1,3 V para garantir a existência de um só pico, o pico da TMP.

3.4.5 Curva de calibração do Trimetoprim

Como anteriormente foi explicado, o grafeno influencia nos limites de deteção e a sensibilidade do sensor. Na figura 3.8 estão registados os voltamogramas para uma solução de TMP e pode-se verificar as diferenças existentes ao nível de deteção entre um MIP preparado com ou sem grafeno.

É bastante perceptível que com a presença de grafeno, consegue-se melhorar a capacidade de deteção do fármaco. Na figura 3.8 a) o MIP foi preparado com grafeno e conseguiu-se efectuar uma deteção do TMP até concentrações da ordem de 10^{-7} mol/L. Na figura 3.8 b) o MIP foi preparado sem grafeno e a deteção foi possível até concentração da ordem de 10^{-5} mol/L.

Com a aplicação do grafeno, conferimos uma maior estabilidade ao polímero,

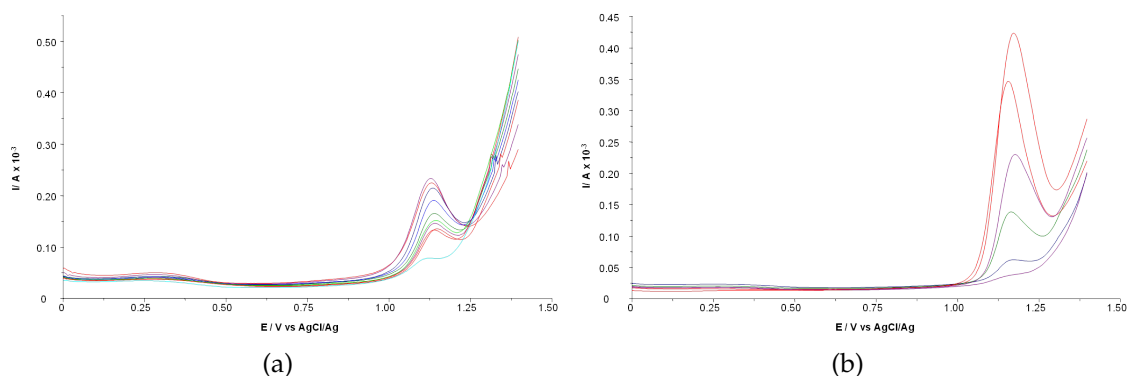


Fig. 3.8: Voltamogramas obtidos para soluções padrão de TMP de concentrações 0,01 a $1,0 \times 10^{-7}$: (a) MIP com grafeno e (b) MIP sem grafeno.

para além de aumentarmos a área do eletrodo. O mesmo acontece em muitos os trabalhos publicados com grafeno, ainda que noutras áreas [120].

Apartir dos voltamogramas traçou-se a curva de calibração (figura 3.9) e determinou-se o limite de deteção e quantificação do método para o fármaco.

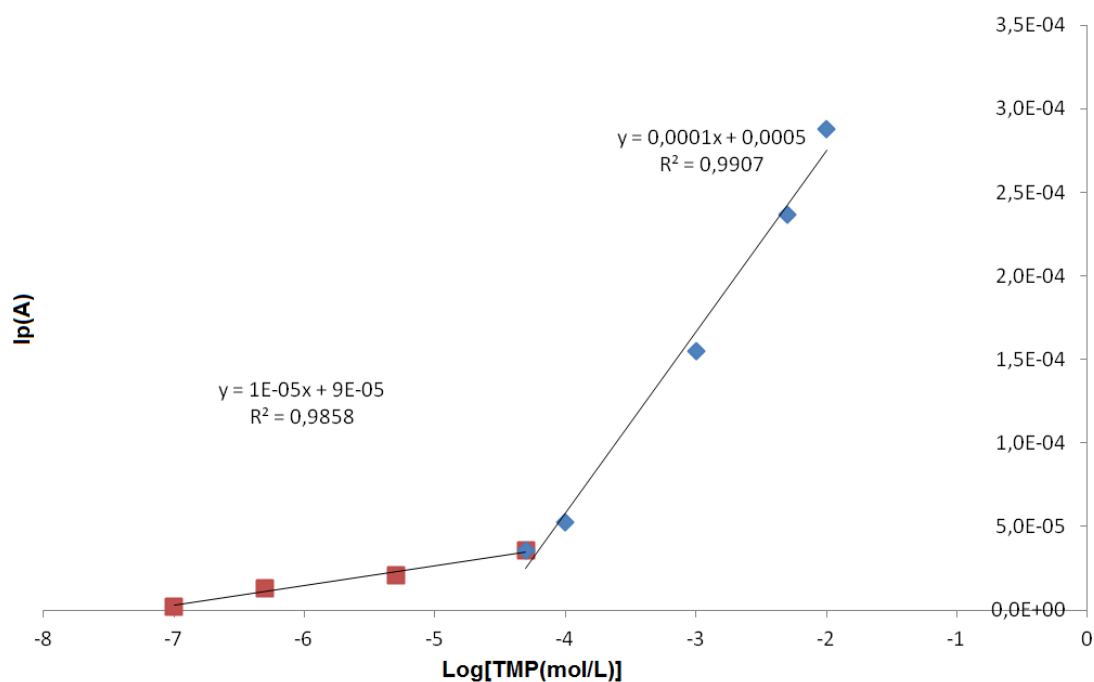


Fig. 3.9: Representação gráfica correspondente aos voltamogramas de TMP, curva de calibração e coeficientes de determinação.

O sensor desenvolvido foi testado aplicando-o na determinação do TMP. Na figura 3.9 representa-se graficamente, a intensidade de corrente (em A) em função do logaritmo da concentração de TMP. Como se pode verificar existem duas zonas de linearidade em que qualquer uma das retas de aproximação apresenta coeficientes de determinação superiores a 0,98. Seguindo as recomendações da

IUPAC [121] e o procedimento sugerido por Hayashi *et.al.* [122], [123] foram estimados os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Para a gama 1×10^{-7} a 5×10^{-5} mol/L o LOQ e o LOD terão os valores de $9,96 \times 10^{-7}$ e $1,30 \times 10^{-7}$ mol/L, respetivamente.

3.4.6 Doseamento de TMP em amostras de urina

O MIP desenvolvido foi testado no doseamento em amostras de urina. As amostras foram sujeitas a uma centrifugação a 3000 rpm's para precipitação das proteínas como descrito em 2.3.6. Os resultados para os testes na urina são apresentados no capítulo 3.10.

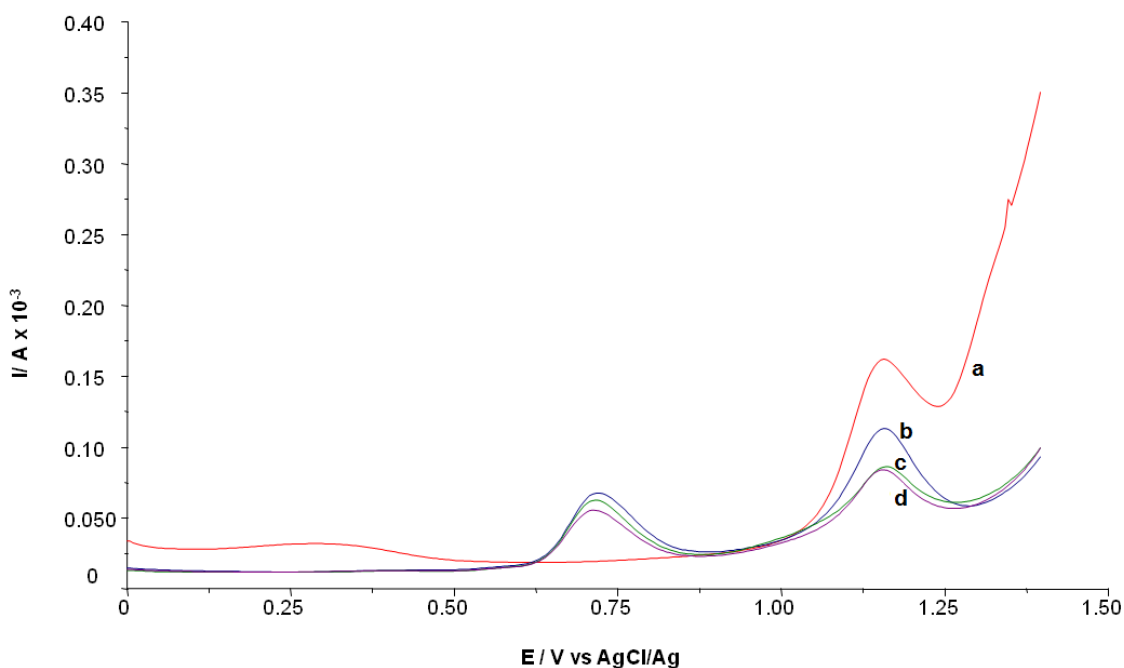


Fig. 3.10: Aplicação real: testes de detecção da trimetoprim, em amostra de urina real, a uma concentração de 10^{-4} mol/L: (a) voltamograma da curva de calibração, (b), (c) e (d) voltamogramas dos testes realizados na urina.

Prepararam-se soluções com diferentes concentrações de TMP em urina. Os ensaios foram repetidos 3 vezes. Após a análise dos resultados verificasse que os desvios das determinações foram inferiores a 11%. Calculados os índices de recuperação os valores obtidos foram de $94,9\% \pm 11\%$.

O sinal analítico correspondente ao TMP surge ao potencial de +1,1 V. Ao potencial de +0,7 V surgem picos em todas as amostras. Estes resultados sugerem que existe algum interferente na urina que é detetado pelo sensor. Noutros estudos que utilizam urina como amostras biológicas, também se deparam com esta situação [124]. Choi *et al.* verificaram que o pico do ácido úrico e do ácido ascórbico surgem a potenciais superiores a +0,5 V, o que pode coincidir com estes

testes. Esta informação carece ainda de confirmação.

O sensor desenvolvido permite detetar TMP em amostras de urina.

3.5 Norfloxacin

3.5.1 Preparação do MIP para a Norfloxacin

A preparação do MIP para a Norfloxacin (NFX) foi efetuada de modo semelhante à descrita para o TMP. O polímero selecionado foi o pirrol. Começou-se por mergulhar o elétrodo de carbono vítreo após tratamento mecânico e eletroquímico numa solução do polímero e na presença do fármaco (MIP) e na ausência do NFX (NIP). A polimerização do pirrol à superfície do elétrodo foi efetuada fazendo varrer o potencial entre os 0 a +1,0 V vs AgCl/Ag [116]. Os varrimentos ocorreram a uma velocidade de 0,1 V/s durante 10 ciclos, condições adequadas para a obtenção das condições ótimas.

Antes porém da polimerização cíclica foi efetuada uma polimerização eletroestática, fixando o potencial em +1,2 V durante 90 s. Esta técnica permite a adesão das moléculas da norfloxacin na superfície do elétrodo. Verificou-se que uma polimerização por voltametria cíclica era insuficiente para a obtenção de um MIP ótimo, à semelhança do que o que foi feito no caso do TMP.

Na figura 3.11 são apresentados os voltamogramas resultantes da polimerização por aplicação de vários ciclos de varrimento de potencial usando a voltametria cíclica, sabendo que anteriormente foi então aplicada uma polimerização eletroestática.

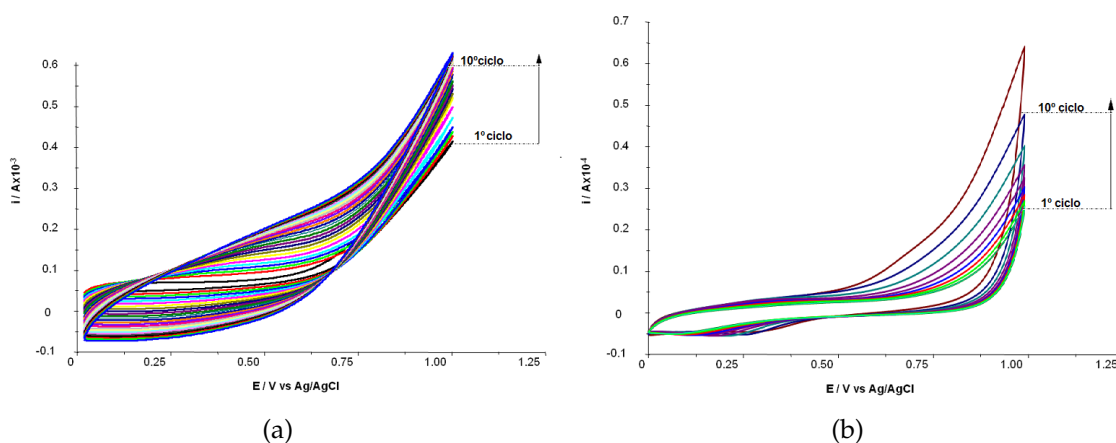


Fig. 3.11: Perfis de Polimerização:(a) MIP e (b) NIP.

Como se pode observar a forma dos voltamogramas, ciclo a ciclo, comprova a formação do filme à superfície do elétrodo (figura 3.11 a). Como referido

anteriormente na polimerização da TMP, o pirrol apresenta boas características de polimerização [116] e [117].

Foi estudado o número de varrimentos que tornaram o polímero ótimo: quanto mais ciclos fossem aplicados, maior era o número de moléculas de fármaco que ficariam incorporadas no polímero resultando um problema para a remoção do fármaco, bem como, aumentava a instabilidade no polímero que tenderia a soltar-se da superfície do eletrodo pelo peso e por gravidade. Por isso escolheram-se os 10 ciclos como valor ideal.

O intervalo de potencial aplicado foi dos 0 aos +1,0 V por ser suficiente para a polimerização do pirrol [116]. O potencial de pico para a Norfloxacin e é cerca de +1,11 V, como apresenta [125] no seu trabalho sobre a caracterização de alguns fármacos, incluindo trimetoprim. A velocidade de varrimento usada no traçar dos voltamogramas cíclicos foi otimizada tendo-se fixado o valor de 0,1 V/s

3.5.2 Sobreoxidação do MIP e NIP

A sobreoxidação foi aplicada ao MIP e ao NIP para conferir estabilidade ao polímero. Os resultados podem ser visualizados na figura 3.12.

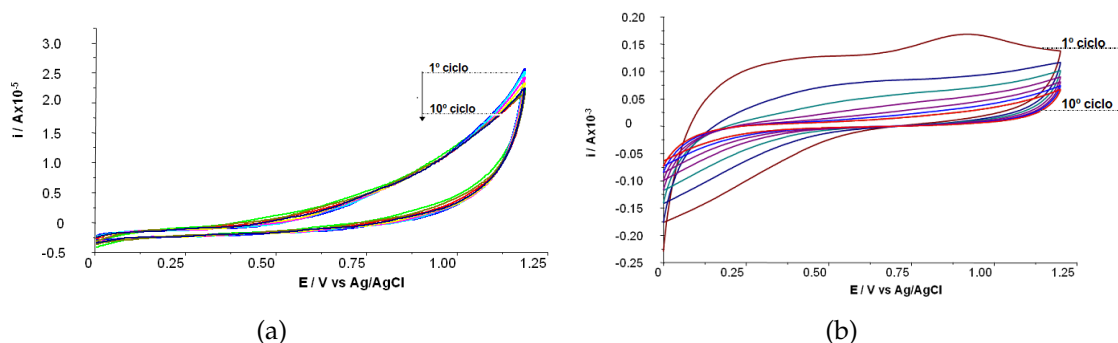


Fig. 3.12: Perfis de sobreoxidação: (a) MIP e (b) NIP.

Foram aplicadas as mesmas condições de polimerização e as mesmas condições de sobreoxidação para poder efetuar comparações. O eletrodo foi colocado na célula eletroquímica numa solução de tampão fosfato (PBS) de pH 10. Efetuaram-se 10 ciclos por voltametria cíclica entre 0 e +1,2 V e à velocidade de 0,1 mV/s. Este procedimento é exatamente igual ao usado na preparação do sensor do TMP.

O perfil dos voltamogramas vão diminuindo, tornando-se cada vez menos espessos e estabilizando. Estas características estão referenciadas por Wen et al. [119] num estudo que fizeram com pirrol. Por isso, este processo é sempre executado para uma maior durabilidade do sensor.

3.5.3 Detecção de NFX por voltametria cíclica

Após a preparação do MIP à superfície do eletrodo de carbono vítreo na presença de NFX e comparando os voltamogramas cíclicos com os obtidos com os NIPs foi possível verificar que os eletrodos modificados não apresentavam grande sensibilidade para a NFX. A NFX é pouco eletroativa. Para ultrapassar esse problema procurou-se usar o método indireto para esta detecção, que consistiu na medição do sinal obtido pelo sensor refere a resposta de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, método normalmente utilizado para este tipo de análises.

Quando é preparado um MIP a superfície encontra-se completamente bloqueada. Fazendo uma leitura indireta, registrando o sinal do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, se o MIP possui o fármaco aderido à superfície, há um bloqueio ao sinal do par dos complexos de ferro.

Quando o fármaco é removido do MIP, as cavidades ficam livres, o que permite a detecção dos íons complexos de ferro em solução. Neste caso é possível identificar o pico do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a um potencial próximo de +0,2 V, como se verifica no voltamograma da figura 3.13.

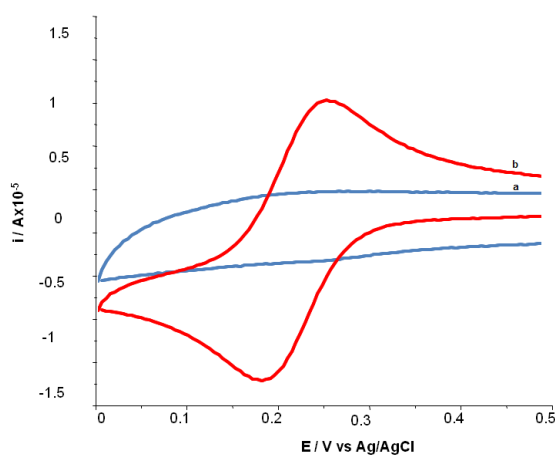


Fig. 3.13: Diferença entre MIP com(a)/sem(b) NFX, pelo método de voltametria cíclica.

A remoção da NFX foi otimizada fazendo variar a composição da solução capaz de remover a NFX sem afetar o polímero. A solução escolhida foi de hidróxido de sódio de 0,05 mol/L. A NFX ao ser removida deixa cavidades expostas e, por isso, capazes de detetar o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

3.5.4 Detecção de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ por onda quadrada para determinação da NFX

A voltametria de onda quadrada quando aplicada a sistemas reversíveis permite obter sinais mais intensos aumentando a sensibilidade. Deste modo mediu-se a intensidade de corrente do pico do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, quando foi retirado o fármaco

do MIP por dissolução e ao contrário, quando foi incorporada a NFX no polímero, como se verifica nos voltamogramas traçados na figura 3.14.

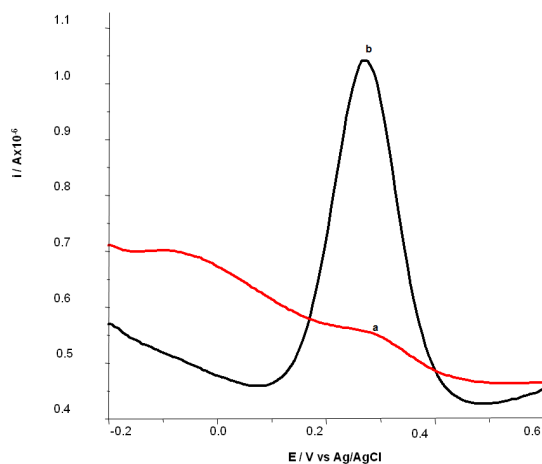


Fig. 3.14: Diferença entre MIP com (a)/sem (b) NFX, pelo método onda quadrada.

Quando se efetua a remoção do fármaco do MIP, por dissolução em solução de hidróxido de sódio a 0,05 M, o voltamograma cíclico apresenta uma forma típica do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ com os picos bem definidos. Isto significa que as cavidades vazias do polímero são superfícies ativas. Pelo contrário, quando se coloca o sensor numa solução de elevada concentração de NFX neste caso, 10^{-2} mol/L, as moléculas do fármaco completam os espaços vazios no MIP e ocorre um bloqueio à reação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. O voltamograma resultante não apresenta os picos e a forma característica, apresentando a forma de um branco. Esta técnica de onda quadrada é aplicada no intervalo de potencial de -0,2 V a +0,6 V, sendo que o pico do ferro verificasse ao potencial de +0,2 V, aproximadamente.

3.5.5 Curva de calibração da Norfloxacin

A preparação do MIP nas condições anteriormente enunciadas, permitiram obter voltamogramas com picos definidos para o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como se pode observar na figura 3.15.

Como foi referido a deteção da NFX será efetuada por via indireta na medida em que a intensidade da corrente de pico é a do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ que será tanto menor quanto maior a concentração de NFX. O fármaco ocupa as cavidades do polímero e impede a reação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Para a concentração 1×10^{-2} mol/L de NFX o bloqueio é total e não se deteta o pico de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Se se diminuir a concentração de NFX para 1×10^{-3} mol/L, algumas cavidades estarão livres e o voltamograma apresenta um pico característico do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Assim a diminuição do pico do ferro, estará diretamente relacionado com o aumento da

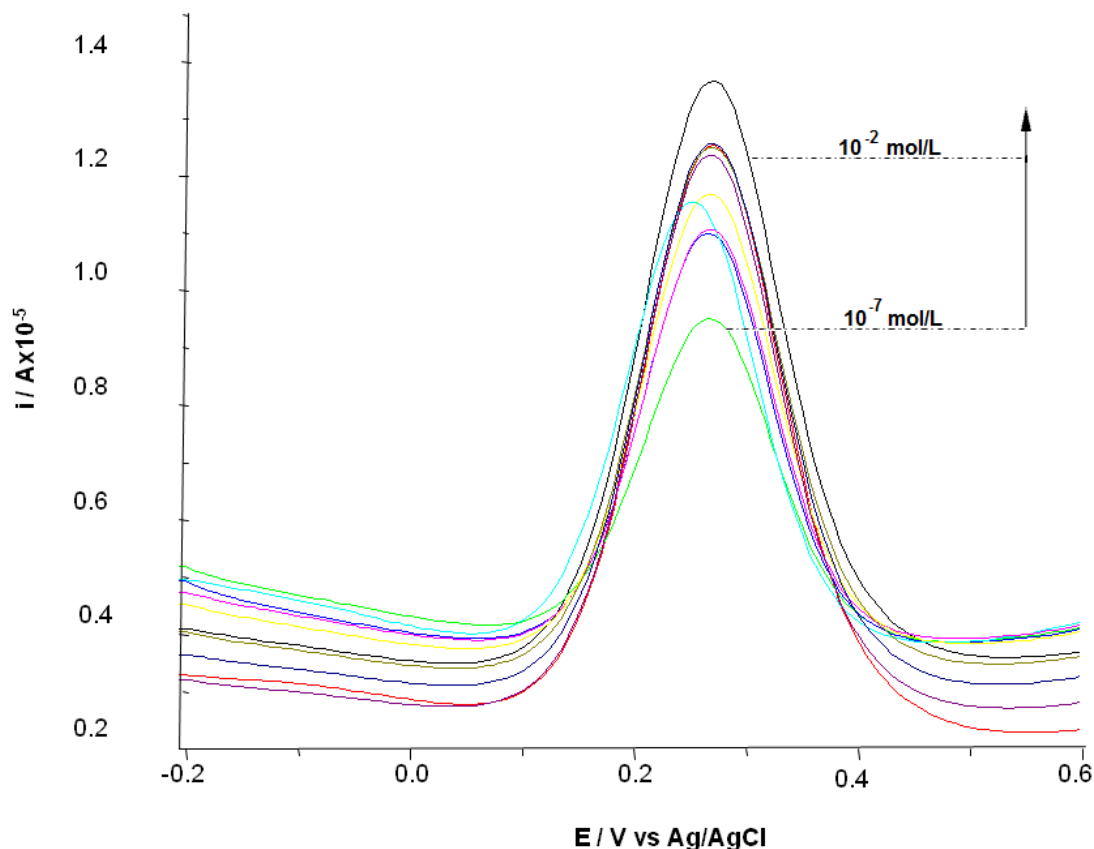


Fig. 3.15: Comparação entre os níveis de detecção da NFX.

concentração da NFX.

Apartir dos voltamogramas traçou-se a curva de calibração (figura 3.16) e determinou-se o limite de detecção e quantificação do método para o fármaco.

O sensor desenvolvido foi testado aplicando-o na determinação da NFX. Na figura 3.16 representa-se graficamente, a intensidade de corrente (em A) em função do logaritmo da concentração da NFX. Como se pode verificar existe uma linearidade na reta de aproximação, em que apresenta um coeficiente de determinação superiores a 0,98. Seguindo as recomendações da IUPAC [121] e o procedimento sugerido por Hayashi *et.al.* [122], [123] foram estimados os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Para a gama 1×10^{-2} a 1×10^{-7} mol/L o LOQ e o LOD terão os valores de $6,37 \times 10^{-6}$ e $8,31 \times 10^{-7}$ mol/L, respetivamente.

3.5.6 Estudo de Impedância

A impedância foi um método de caracterização de superfície utilizado durante a preparação do MIP e NIP da NFX. A otimização do número de ciclos de polimerização, bem como, a perceção do tempo de remoção, foi feito com o auxílio desta técnica eletroquímica.

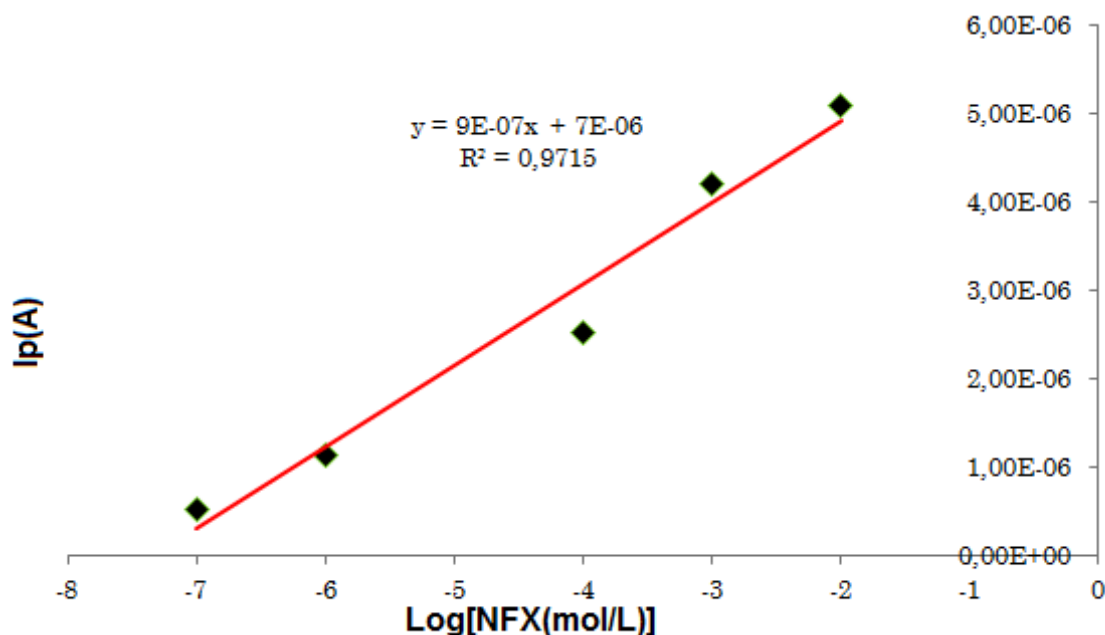


Fig. 3.16: Curva de calibração para a detecção da NFX.

Na figura 3.17 são registados alguns resultados relativos ao estudo da resistividade do MIP à passagem da corrente elétrica em diferentes fases, tais como, após a polimerização, após a sobreoxidação e após diferentes fases de dissolução da NFX.

Na figura 3.17 a) pode-se observar o comportamento do eletrodo de carbono vítreo. O seu comportamento sugere a ocorrência de um processo difusional, isto é, há a movimentação das espécies químicas, iões e moléculas, entre a solução e a superfície do eletrodo mas não são adsorvidas.

Para a preparação do MIP, como referido anteriormente, foi efetuada uma polimerização. Comparativamente ao resultado anterior do eletrodo de carbono não modificado, com a polimerização a resistividade aumenta, como se verifica na figura 3.17 d). Normalmente, a resposta dos filmes à condutividade elétrica demonstra um arco completo. Neste caso isso não acontece, o que poderia sugerir um aumento da gama de frequências para a resolução deste problema. A medição deste arco indica que quanto maior ele for, maior será a resistividade ao meio. Porém, depois de polimerizar, o processo difusional não é comprometido. Após a sobreoxidação, figura 3.17 e), a resistividade aumenta ligeiramente em relação à polimerização, diferença esta quase insignificante.

Relativamente às figuras 3.17 b) e c), estas correspondem ao comportamento após a remoção do fármaco, 10 e 5 minutos respetivamente. Nota-se que há um decréscimo na resistividade. Com isto pode-se afirmar que a transferência de carga torna-se mais facilitada, verificada pelas cavidades libertadas pela diluição do fármaco.

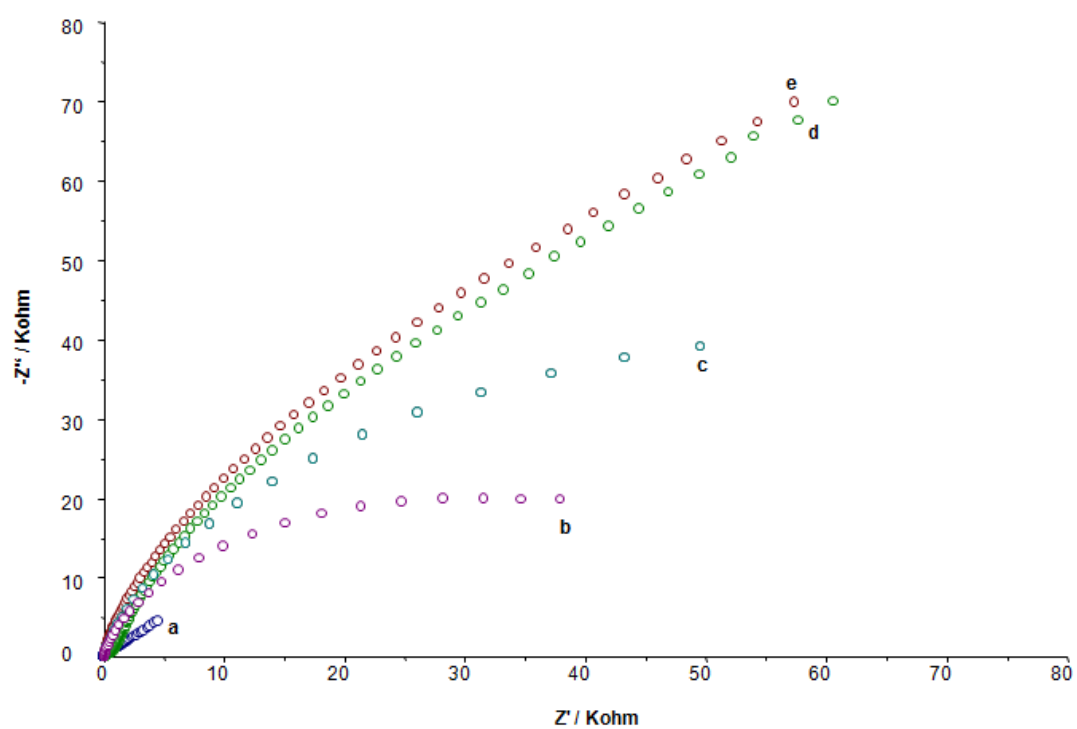


Fig. 3.17: Estudo de impedanciometria para a caracterização do MIP da NFX.

Conclusão

O grande interesse na determinação de fármacos em fluidos biológicos, nomeadamente na urina, para avaliação da dosagem ótima a administrar a cada paciente e estudar o ciclo do medicamento no organismo, justifica o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais sensíveis e precisos. A maioria destes métodos necessita de pré-tratamento de amostra, técnicos altamente qualificados e instrumentos sofisticados, sendo dispendiosos e demorados.

As técnicas eletroquímicas são alternativas cada vez mais recorrentes contribuindo para isso o desenvolvimento de sensores. Os sensores eletroquímicos construídos sobre elétrodos e modificados, por exemplo, com polímeros molecularmente impressos (MIP) foram desenvolvidos neste trabalho e aplicados na análise de dois antibióticos, Trimetoprim (TMP) e Norfloxacin (NFX) em amostras de urina contaminadas. Esta tecnologia apresenta-se muito promissora para o desenvolvimento de sensores químicos, principalmente no que diz respeito à seletividade e estabilidade. Existem várias estratégias para imobilização dos MIP na superfície dos transdutores. Os MIP filmes foram preparados por eletropolimerização de polipirrol, utilizando a voltametria cíclica (CV), num elétrodo de carbono vítreo, na presença da molécula molde (os fármacos). Para melhor adesão do polímero à superfície do transdutor foi efetuada sobreoxidação num passo prévio à eletropolimerização. Após a polimerização as moléculas de cada fármaco foram removidas do polímero usando um solvente apropriado, solução mistura de hidróxido de sódio e metanol (50/50) no caso do TMP e solução de hidróxido de sódio no caso de NFX. O sensor foi incubado com diferentes concentrações de fármaco para um tempo de incubação definido e utilizando a voltametria de onda quadrada para a quantificação dos fármacos pelo método direto no caso do TMP e pelo método indireto usando o sinal do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ no caso da NFX. Um elétrodo não-impresso (NIP) foi usado como controle para cada um dos fármacos. Para isso foram preparados NIPs, usando

o procedimento de polimerização sem a presença de molde. Os sensores desenvolvidos foram usados para quantificar o TMP e a NFX em amostras de urina fortificadas. As razões de recuperação foram superiores a 94,9%, em ambas as situações. Com os sensores desenvolvidos foi possível obter limites de detecção de $6,37 \cdot 10^{-7}$ e $1,30 \cdot 10^{-7}$ mol/l para NFX e TMP, e limites de quantificação de $6,37 \cdot 10^{-6}$ e $9,96 \cdot 10^{-7}$ mol/l, respetivamente. Não foi possível avaliar possíveis interferentes nas amostras de urina no entanto nos resultados parecem apontar que quer o ácido úrico quer o ácido ascórbico não apresentam sinal eletroquímico ao potencial de detecção de qualquer um dos fármacos. Mais estudos deverão ser realizados. É ainda importante avaliar a robustez dos sensores construídos com ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade.

Pode-se concluir que a tecnologia de polímeros molecularmente impressos oferece grandes vantagens na preparação de sensores químicos, mais estáveis, robustos e seletivos. Para além disso, os sensores possuem tempos de resposta curtos e as amostras poderão não necessitar de pré-tratamento. A aplicação a amostras reais é ainda uma realidade diminuta existindo lugar a estudos de investigação que permitam contribuir para a construção de MIPs que possam ser produzidos em larga escala.

Bibliografia

- [1] J. C. Sousa, *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Porto: Fundação Fernando Pessoa, 2005. ISBN:972-8830-41-6.
- [2] J. L. Vílchez, O. Ballesteros, J. Taoufiki, G. Sánchez-Palencia, and A. Navalón, "Determination of the antibacterial norfloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry," *Analytica Chimica Acta*, no. 444, pp. 279–286, 2001.
- [3] M. Sousa and C. Barbosa, "Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. parte i: Síntese e caracterização," *Química Nova*, vol. 32, no. 6, pp. 1609–1619, 2009.
- [4] K. Drlica and X. Zhao, "Dna gyrase, topoisomerase iv, and the 4-quinolones," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 61, no. 3, pp. 377–392, 1997. Public Health Research Institute.
- [5] Infarmed, "Resumo das características do medicamento," *INFARMED*, Junho 2011.
- [6] T. Rebelo, S. Almeida, J. Guerreiro, M. Montenegro, and M. Sales, "Trimethoprim-selective electrodes with molecularly imprinted polymers acting as ionophores and potentiometric transduction on graphite solid-contact," *Microchemical Journal*, vol. 98, no. 1, pp. 21–28, 2011.
- [7] Infarmed, "Folheto informativo," *INFARMED*, Janeiro 2005.
- [8] F. Léo, F. campos, M. Dabus, S. Lima, C. Trentin, D. Negri, and M. Pereira, "Farmacocinética e farmacodinâmica da associação das sulfas e trimetoprim," *Revista Científica de medicina veterinária*, Janeiro 2009. ISSN:1679-7353.
- [9] R. Hirsh, T. Ternes, K. Haberer, and K. L. Kratz, "Occurrence of antibiotics in the aquatic environment," *Science of antibiotics in the aquatic environment*, vol. 225, pp. 109–118, 1999.
- [10] B. Halling-Sorensen, S. Nielsen, P. Lansky, F. Ingerslev, H. Liitzhofl, and S. Jorgensen, "Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment a review," *Chemosphere*, vol. 36, pp. 357–393, 1998.
- [11] N. Kemper, "Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment," *Ecological Indicators*, vol. 8, pp. 1–13, 2008.

- [12] D. Kathryn, K. Jerzy, T. Bruce, H. Timothy, and B. Douglas, "Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the rio grande in new mexico," *Science of the total environment*, vol. 366, pp. 772–783, 2005.
- [13] A. Alder, C. McArdell, E. Golet, E. Molnar, H. Kuch, and W. Giger, "Environmental exposure of antibacterial agents in hospital and municipal wastewater and river water in switzerland," in *Proceedings of 3rd International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water*, p. 236, 2003.
- [14] Y. M. Liu, J. T. Cao, W. Tian, and Y. L. Zheng, "Determination of levofloxacin and norfloxacin by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection and applications in human urine," *Electrophoresis*, no. 29, pp. 3207–3212, 2008.
- [15] A. Alnajjar, H. H. AbuSeada, and A. M. Idris, "Capillary electrophoresis for the determination of norfloxacin and tinidazole in pharmaceuticals with multi-response optimization," *Talanta*, vol. 72, no. 2, pp. 842–846, 2007.
- [16] J. L. Rufino, H. R. Pezza, and L. Pezza, "Sequential injection analysis with spectrophotometric detection for determination of norfloxacin and ciprofloxacin in pharmaceutical formulations," *Quimica Nova*, vol. 34, no. 2, pp. 256–261, 2011.
- [17] Y.-M. Liu, L. Mei, H.-Y. Yue, Y.-M. Shi, and L.-J. Liu, "Highly sensitive chemiluminescence detection of norfloxacin and ciprofloxacin in ce and its applications," *Chromatographia*, vol. 72, no. 3, pp. 337–341, 2010.
- [18] K. J. Huanh, C. X. Xu, and W. Z. Xie, "Electrochemical behavior of norfloxacin and its determination at poly(methyl red) film coated glassy carbon electrode," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 29, no. 5, pp. 988–992, 2008.
- [19] M. Sher, M. A. Hussain, M. H. Mehmood, M. N. Hassan, and S. Bashir, "Bioequivalence of norfloxacin by hplv-uv method," *J. Chil. Chem. Soc.*, vol. 55, no. 2, p. 2009, 2010.
- [20] J. Jinqing, Z. Haitang, L. Junwei, L. Junmin, and W. Ziliang, "Development and optimization of an indirect competitive elisa for detection of norfloxacin residue in chicken liver," in *Norfloxacin Residue in Chicken Liver*, (Singapore), IACSIT Press, 2011.
- [21] C. J. Veiopoulou, P. C. Ioannou, and E. S. Lianidou, "Application of terbium sensitized fluorescence for the determination of fluoroquinolone antibiotics pefloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin in serum," *J. of Pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 15, pp. 1839–1884, 1997.
- [22] M. M. Ghoneim, A. Radi, and A. M. Beltagi, "Determination of norfloxacin by square-wave adsorptive voltammetry on a glassy carbon electrode," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 25, no. 2, pp. 205–10, 2001.

- [23] D. F. Gobatto, A. Wong, M. V. Lanza, and M. T. Sotomayor, "Development of biomimetic sensor for fast and sensitive detection of norfloxacin," *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*, no. 3, pp. 98–107, 2010.
- [24] R. Goyal, A. Rana, and H. Chasta, "Electrochemical sensor for the sensitive determination of norfloxacin in human urine and pharmaceuticals," *Bioelectrochemistry*, vol. 83, pp. 46–51, 2012.
- [25] H. Mascher and C. Kikuta, "Determination of norfloxacin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection," *Journal of Chromatography A*, vol. 812, pp. 381–385, 1998.
- [26] G. E. Pellegrini, G. Carpico, and E. Coni, "Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk," *Analytica Chimica Acta*, vol. 520, pp. 13–18, 2004.
- [27] L. G. Chatten, B. S. Pons, and P. McLeod, "Electrochemical determination of trimethoprim," *Analyst*, vol. 107, pp. 1026–1031, 1982.
- [28] Y. He, J. Lu, and J. Du, "Molecular imprinting-chemiluminescence determination of trimethoprim using trimethoprim-imprinted polymer as recognition material," *The Royal Society of Chemistry*, vol. 130, pp. 1032–1037, 2005.
- [29] J. J. Berzas, J. Rodríguez, and G. Castañeda, "Partial least squares method in the analysis by square wave voltammetry. simultaneous determination of sulphamethoxypyridazine and trimethoprim," *Analytica Chimica Acta*, vol. 349, pp. 303–311, 1997.
- [30] G. Balizs and A. Hewitt, "Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry," *Analytica Chimica Acta*, vol. 492, no. 2, pp. 105–131, 2003.
- [31] L. Rajith and K. Kumar, "Electroanalysis of trimethoprim on metalloporphyrin incorporated glassy carbon electrode," *Drug Testing and Analysis*, vol. 2, no. 9, pp. 436–441, 2010.
- [32] S. Hu, L. Li, and X. He, "Comparison of trimethoprim molecularly imprinted polymers in bulk and in sphere as the sorbent for solid-phase extraction and extraction of trimethoprim from human urine and pharmaceutical tablet and their determination by high-performance liquid chromatography," *Analytica Acta*, vol. 573, pp. 215–222, 2005.
- [33] D. C. G. Bedor, T. M. Gonçalves, M. L. L. Ferreira, C. E. M. Sousa, A. L. Menezes, E. J. Oliveira, and D. P. Santana, "Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in biological fluids for high-throughput analysis: Comparison of hplc with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection," *Chromatography B*, vol. 863, pp. 46–54, 2008.
- [34] C. Chen, X. Zhang, Z. Long, J. Zhang, and Z. C., "Molecularly imprinted dispersive solid-phase microextraction for determination of sulfamethazine by capillary electrophoresis," *Microchimica Acta*, vol. 178, pp. 293–299, 2012.

- [35] T. González, J. Domínguez, P. Palo, S.-M. J., and E. Cuerda-Correa, "Development and optimization of the bdd-electrochemical oxidation of the antibiotic trimethoprim in aqueous solution," *Desalination*, vol. 280, no. 3, pp. 197–202, 2011.
- [36] M. A. C. Brett, "Uma ciência virada para o futuro na resolução de problemas químicos," *Divisão Química Analítica - Química*, no. 100, pp. 31–33, 2006.
- [37] C. R. Lowe, "Biosensors," *Trends Biotechnol*, vol. 3, pp. 59–65, 1984.
- [38] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*. New-York, 2 ed., 2000. 0 471 28272 3.
- [39] M. Ahmed, M. M. Hossain, and E. Tamiyaa, "Electrochemical biosensors for medical and food applications," *Electroanal*, no. 20, pp. 616–626, 2008.
- [40] C. Brett and A. M. O. Brett, *Electroanalysis*. Coimbra, 1998. 0 19 854816 8.
- [41] J. R. Maloy *Journal of Chemical Education*, vol. 60, pp. 257–392, 1983.
- [42] D. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *fundamentos de Química Analítica*, vol. 8. Spain, 2005.
- [43] D. Souza, L. Codognoto, A. Malagutti, R. Toledo, V. Pedrosa, R. Oliveira, L. Mazo, L. Avaca, and L. Machado, "Voltametria de onda quadrada. segunda parte: Aplicações," *Química Nova*, vol. 27, pp. 790–797, 2004.
- [44] R. Cottis and S. Turgoeses, "Corrosion testing mode easy: electrochemical impedance and noise," *NACE.*, 1999.
- [45] E. A. H. Hall and N. G. Skinner *Synth Met*, pp. 63–163, 1994.
- [46] M. G. S. Ferreira and M. J. J. Ferreira *Eds. INETI*, p. 135, 1991.
- [47] R. Greef, R. Peat, L. M. Peter, and D. Pletcher, *Instrumental Methods in Electrochemistry*. 1985.
- [48] R. S. Freire, C. A. Pessoa, and L. T. Kubota, "Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos," *Química Nova*, vol. 26, pp. 81–389, 2002.
- [49] H. Yunhua, J. Lu, M. Liu, and J. Du, "Molecular imprinting-chemiluminescence determination of trimethoprim using trimethoprim-imprinted polymer as recognition material," *Analyst*, no. 130, pp. 1032–1037, 2005.
- [50] R. J. Ansell, "Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs," *Advanced Drug Delivery Reviews*, no. 57, pp. 1809–1835, 2005.
- [51] H. Hiratini and C. Alvarez-Lorenzo, "Timolol uptake and release by imprinted soft contact lenses made of n,n-diethylacrylamide and methacrylic acid," *Journal of Controlled Release*, no. 2, pp. 223–230, 2002.

- [52] C. Huval, X. Chen, S. Holmes-Farley, W. Mandeville, S. Polomoscanik, R. Sacchiero, and P. Dhall, "Molecularly imprinted bile acid sequestrants: Synthesis and biological studies," *Materials Research Society Proceedings*, vol. 787, 2003. doi: 10.1557/PROC-787-G6.3.
- [53] C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, "Molecularly imprinted polymers for drug delivery," *Journal of Chromatography B*, no. 1, pp. 231–245, 2004.
- [54] A. Mayes and M. Whitcombe, "Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers," *Advanced Drug Delivery Reviews*, no. 12, pp. 1742–1778, 2005.
- [55] C. Nostrum, "Molecular imprinting: A new tool for drug innovation," *Drug Discovery Today: Technologies*, no. 1, pp. 119–124, 2005.
- [56] O. Ramstrom and R. Ansell, "Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future," *Chirality*, no. 3, pp. 195–209, 1998.
- [57] P. Sharma, A. Pietrzyk-Le, F. D'Souza, and W. Kutner, "Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing," *Anal. Bioanal. Chem.*, no. 402, pp. 3177–3204, 2012.
- [58] P. Cormack and A. Elorza, "Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation," *Journal of Chromatography B*, no. 1, pp. 173–182, 2004.
- [59] B. Sellergren and C. Allender, "Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, no. 6, pp. 1733–1741, 2005.
- [60] Y. Yagci and L. Toppare, "Electroactive macromonomers based on pyrrole and thiophene: a versatile route to conducting block and graft polymers," *Polymer International*, no. 10, pp. 1573–1578, 2003.
- [61] E. Turiel and A. Martín-Esteban, "Molecularly imprinted polymers: towards highly selective stationary phase in liquid chromatography and capillary electrophoresis," *Anal. Bioanal. Chem.*, no. 378, p. 1876:1886, 2004.
- [62] F. G. Tamayo, E. Turiel, and A. Martín-Esteban, "Molecularly imprinted polymers for solid-phases extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends," *J Chromatogr A*, no. 1152, p. 32:40, 2007.
- [63] E. Turiel and A. M. Esteban, "Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review," *Anal. Chim. Acta*, no. 668, pp. 87–99, 2010.
- [64] S. Vidyasankar and F. H. Arnold, "Molecular imprinting: selective materials for separations, sensors and catalysis," *Curr. Opin. Biotechnol*, no. 6, p. 218:224, 1995.
- [65] A. McCluskey, C. I. Holdworth, and M. C. Bowyer, "Molecular imprinted polymers (mips): sensing, an explosive new opportunity," *Org. Biomol. Chem.*, no. 5, p. 3233:3244, 2007.

- [66] K. D. Shimizu and C. J. Stephenson, "Molecularly imprinted polymer sensor arrays," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, no. 14, pp. 743–750, 2010.
- [67] S. P. Özkorucuklu, Y. Sahin, and G. Alsancak, "Voltammetric behaviour of sulfamethoxazole on electropolymerized-molecularly imprinted overoxidized polypyrrole," *Sensors*, no. 8, pp. 8463–8478, 2008.
- [68] A. Jaramillo, L. D. Spurlock, V. Young, and A. Brajter-Toth, "Xps characterization of nanosized overoxidized polypyrrole films on graphite electrodes," *Analyst.*, no. 124, pp. 1215–1221, 1999.
- [69] B. Deore, Z. Chen, and T. Nagaoka, "Overoxidized polypyrrole with dopant complementary cavities as a new molecularly imprinted polymer matrix," *Analytical Science.*, no. 15-827, 1999.
- [70] H. Shiigi, M. Kishimoto, H. Yakabe, B. Deore, and T. Nagaoka, "Highly selective molecularly imprinted overoxidized polypyrrole colloids: One-step preparation technique," *Analytical Sciences*, no. 18, p. 41, 2002.
- [71] H. Shiigi, H. Yakabe, M. Kishimoto, D. Kijima, Y. Zhang, S. U., B. Deore, and T. Nagaoka, "Molecularly imprinted overoxidized polypyrrole colloids: Promising materials for molecular recognition," *Microchimica Acta*, vol. 143, no. 2, pp. 155–162, 2003.
- [72] B. Deore and M. S. Freund, "Saccharide imprinting of poly(aniline boronic acid) in the presence of fluoride," *Analyst*, no. 128, pp. 803–806, 2003.
- [73] N. Sallancan, M. Zayats, T. Bourenko, A. B. Kharitonov, and I. Willner, "Imprinting of nucleotide and monosaccharide recognition sites in acrylamidephenylboronic acid-acrylamide copolymer membranes associated with electronic transducers," *Anal. Chem.*, no. 74, pp. 702–712, 2002.
- [74] J. Rick and T. Chou, "Using protein templates to direct the formation of thin-film polymer surfaces," *Biosens. Bioelectron.*, no. 22, pp. 544–549, 2006.
- [75] M. Frasconi, B. Tel-Vered, M. Riskin, and I. Willner, "Surface plasmon resonance analysis of antibiotics using imprinted boronic acid-functionalized au nanoparticle composites," *Anal. Chem.*, no. 82, pp. 2512–2519, 2010.
- [76] F. C. Moraes, *Nanotubos de Carbono no desenvolvimento de sensores eletroquímicos*. PhD thesis, Universidade Federal de São Carlos - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, 2010.
- [77] K. Schubert, G. Goebel, and F. Lisdat, "Bilirubin oxidase bound to multi-walled carbon nanotube-modified gold," *Eleetrochemi. Acta.*, vol. 54, pp. 3033–3039, 2009.
- [78] R. Stradiotto, E. Toghil, L. Xiao, A. Moshar, and G. Compton, "The fabrication and characterization of a nickel nanoparticle modified boron doped diamond electrode for electrocatalysis of primary alcohol oxidation," *Electroanalysis*, vol. 21, pp. 2627–2632, 2009.

- [79] P. Manisankar, L. Abirama-Sundari, and P. Sasikumar, R. and Palaniappan, "Electroanalysis of some common pesticides using conducting polymer/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode," *Talanta*, vol. 76, pp. 1022–1029, 2008.
- [80] S. Zhang, M. Xu, and Y. Zhanga, "Nanoparticles/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite film modified electrode," *Electroanalysis*, vol. 21, p. 2607, 2009.
- [81] X. Yang, L. Liu, H. Zhu, R. Chen, J. Mu, N. Liu, and Q. Jia, "Preparation, characterization, magnetic property, and mossbauer spectra of the b-feooh nanoparticles modified by nonionic surfactant," *Journal Magn. Mater.*, vol. 320, pp. 132–136, 2008.
- [82] D. DelCarlo, M. and Campagnoned, "Recent advances in biosensor technology for food safety," *AgroFood industry hi-tech*, vol. 19, pp. 3–7, 2008.
- [83] A. S. Dios and M. E. Díaz-García, "Multifunctional nanoparticles: analytical prospects," *Anal. Chim. Acta*, vol. 666, pp. 1–22, 2010.
- [84] K. Kim, W. Voit, W. Zapka, B. Bjelke, M. Muhammed, and V. Rao, "Biomedical application of ferrofluids containing magnetite nanoparticles," *Mater Res Soc Symp Proc*, vol. 676, pp. 31–36, 2001.
- [85] A. Sperling, R. Gil, F. Zhang, M. Zanella, and J. Parak, "Biological applications of gold nanoparticles," *Chem Soc Rev*, vol. 37, pp. 1896–1908, 2008.
- [86] S. Stankovich, D. Dikin, R. Piner, K. Kohlhaas, Y. Kleinhammes, A. and Jia, Y. Wu, S. Nguyen, and R. S. Ruoff, "Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide," *Carbon*, vol. 45, pp. 1558–1565, 2007.
- [87] G. V. Titelman, V. Gelman, S. Bron, R. L. Khalfin, Y. Cohen, and H. Bianco-Peled, "Characteristics and microstructure of aqueous colloidal dispersions of graphie oxide," *Carbon*, vol. 43, pp. 641–649, 2005.
- [88] T. Szabo, E. Tombacz, E. Illes, and I. Dekany, "Enhanced acidity and pH-dependent surface charge characterization of successively oxidized graphite oxides," *Carbon*, vol. 43, pp. 537–545, 2006.
- [89] H. P. Boehm, "Graphene-how a laboratory curiosity suddenly became extremely interesting," *Angewandte Chemie*, vol. 49, pp. 9332–9335, 2010.
- [90] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, Y. Jiang, D. and Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, and A. A. Firsov, "Electric field effect in atomically thin carbon films," *Science* 22, vol. 306, pp. 666–669, 2004.
- [91] E. C. H. Sykes, "Nature chemistry," vol. 1, no. 175-176, 2009.
- [92] A. K. Geim and K. S. Novoselov, "The rise of graphene," *Nature Materials*, vol. 6, pp. 183–191, 2007.

- [93] X. Zuo, S. He, L. D., C. Peng, Q. Huang, S. Song, and C. Fan, "Graphene oxide-facilitated electron transfer of metalloproteins at electrode surfaces," *Langmuir*, vol. 26, pp. 1936–1939, 2010.
- [94] V. Singh, D. Joung, L. Zhai, S. Das, S. Khondaker, and S. Seal, "Graphene based materials: Past, present and future," *Progress in Materials Science*, vol. 56, pp. 1178–1271, 2011.
- [95] W. L. Zhang, Y. D. Liu, and H. J. Choi, "Fabrication of semiconducting graphene oxide/polyaniline composite particles and their electrorheological response under an applied electric field," *Carbon*, vol. 50, pp. 290–296, 2012.
- [96] M. J. Allen, V. C. Tung, and R. B. Kaner, "Honeycom carbon: a review of graphene," *Chemical Reviews*, vol. 110, pp. 132–145, 2010.
- [97] J. Wang, "Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review," *Electroanalysis*, vol. 17, pp. 7–14, 2005.
- [98] W. Kundhikanjana, a. W. H. L. Lai, K. L. M. A. Kelly, and Z. X. Shen, "Hierarchy of electronic properties of chemically derived and pristine graphene probed by microwave imaging," *Nano Letters*, vol. 9, pp. 3762–3765, 2009.
- [99] C. S. Shan, H. F. Yang, D. X. Han, Q. X. Zhang, A. Ivaska, and L. Niu, "Water-soluble graphene covalently functionalized by biocompatible poly-L-lysine," *Langmuir*, vol. 25, pp. 12030–12033, 2009.
- [100] F. H. Li, S. C. S. Yang, H. F. and, Q. X. Zhang, D. X. Han, A. Ivaska, and L. Niu, "The synthesis of perylene-coated graphene sheets decorated with au nanoparticles and its electrocatalysis toward oxygen reduction," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 19, pp. 4022–4025, 2009.
- [101] M. Hilder, B. W. Jensen, D. Li, M. Forsyth, and D. R. MacFarlane, "Direct electro-deposition of graphene from aqueous suspensions," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 13, pp. 9187–9193, 2011.
- [102] X. Yang, X. Dou, A. Rouhanipour, L. J. Zhi, H. J. Rader, and K. Mullen, "Two-dimensional graphene nanoribbons," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, pp. 4216–3288, 2008.
- [103] H. G. Duan, E. Q. Xie, L. Han, and Z. Xu, "Turning pmma nanofibers into graphene nanoribbons by in situ electron beam irradiation," *Advanced Materials*, vol. 20, pp. 3284–3288, 2008.
- [104] A. Y. Wang, N. Li, Z. J. Shi, and Z. N. Gu, "Low-cost and large-scale synthesis of graphene nanosheets by arc discharge in air," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 1, 2010.
- [105] G. Eda, G. Fanchini, and M. Chhowalla, "Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material," *Nature Nanotechnology*, vol. 3, pp. 270–274, 2008.
- [106] A. Lerf, H. Y. He, M. Forster, and J. Klinowski, "Structure of graphite oxide revisited," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 102, pp. 447–4482, 1998.

- [107] X. L. Li, H. L. Wang, J. T. Robinson, H. Sanchez, G. Diankov, and H. J. Dai, "Solvothermal reduction of chemically exfoliated graphene sheets," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, pp. 9910–9910, 2009.
- [108] Q. He, H. G. Sudibya, Z. Yin, S. Wu, F. Li, F. Boev, W. Huang, P. Chen, and H. Zhang, "Centimeter-long and large-scale micropatterns of reduced graphene oxide films: Fabrication and sensing applications," *ACS Nano*, vol. 4, p. 3201, 2010.
- [109] C. Zhu, J. Zhai, D. Wen, and S. Dong, "Graphene oxide/polypyrrole nanocomposites: one-step electrochemical doping, coating and synergistic effect for energy storage," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 22, pp. 6300–6036, 2012.
- [110] J. Liu, H. Bai, Z. Wang, Liu, X. Zhang, and D. D. Sun, "Self-assembling tio₂ on large graphene oxide sheets at a two-phase interface and their anti-recombination in photocatalytic applications," *Advanced Functional Materials*, vol. 20, no. 4175-4181, 2010.
- [111] F. Zhang, B. Zheng, J. Zhang, X. Huanhg, H. Liu, and S. Guo, "Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: Physical properties and applications in phenolic compound removal," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 114, pp. 8469–8473, 2010.
- [112] N. Kovtyukhova, P. Ollivier, B. Martin, M. T.E., S. Chizhik, E. Buzaneva, and G. A.D., "Layer-by-layer assembly of ultrathin composite films from micron-sized graphte oxide sheets and polycations," *Chemestry of Materials*, vol. 11, pp. 771–778, 1999.
- [113] H. Zheng, L. Lin, Y. Okezaki, R. Kawakami, H. Sakuraba, T. Ohshima, K. Takagi, and S. Suye, "Electrochemical behavior of dye-linked l-proline dehydrogenase on glassy carbon electrodes modified by multi-walled carbon nanotubes," *Beilstein Journal of Nanotechnology*, no. 1, pp. 135–141, 2010.
- [114] G. Liu, S. Riechers, M. Mellen, and Y. Lin, "Sensitive electrochemical detection of enzymatically generated thiocholine at carbon nanotube modified glassy carbon electrode," *Electrochemistry communications*, no. 7, pp. 1163–1169, 2005.
- [115] D. Geng, S. Yang, Y. Zhang, J. Yang, J. Liu, R. Li, T. Sham, X. Sun, S. Ye, and S. Knights, "Nitrogen doping effects on the structure of graphene," *Applied Surface Science*, no. 257, pp. 9193–9198, 2011.
- [116] R. Haddad, S. Cosnier, A. Maaref, and M. Holzinger, "Non-covalent bio-functionalization of single-walled carbon nanotubes via biotin attachment by p-stacking interactions and pyrrole polymerization," *Analyst*, no. 134, pp. 2412–2118, 2009.
- [117] Y. Yuan, S. Adeloju, and G. Wallace, "In-situ electrochemical studies on the redox properties of polypyrrole in aqueous solutions," *European Polymer Journal*, no. 35, pp. 1761–1772, 1999.

- [118] C. Souza, O. Braga, I. Vieira, and A. Spinelli, "Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode," *Sensors and Actuators B: Chemical*, no. 135, pp. 66–73, 2008.
- [119] J. Wen, L. Zhou, X. Cao, and B. Ye, "Overoxidized polypyrrole/multi-walled carbon nanotubes composite modified electrode for in vivo liquid chromatography-electrochemical detection of dopamine," *Journal of Chromatography B*, no. 877, pp. 1793–1798, 2009.
- [120] S. Uhm, N. Tuyen, and J. Lee, "Controlling oxygen functional species of graphene oxide for an electro-oxidation of l-ascorbic acid," *Electrochemistry*, no. 13, pp. 677–680, 2011.
- [121] L. A. Currie, "Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities," *Pure and Appl. Chem. - IUPAC Commission on Analytical Nomenclature*, vol. 69, p. 1699, 1995.
- [122] Y. Hayashi, R. Matsuda, K. Ito, W. Nishimura, K. Imai, and M. Maeda *Anal. Sci.*, p. 21:167, 2005.
- [123] ISO, "Capability of detection. part 5: Methodology in the linear and non-linear calibration cases," *International Standardization Organization - IUPAC Commission on Analytical Nomenclature*, 2008. 11843-5.
- [124] Y. Choi, W. Jeon, and H. Kim, "Electrochemical immunoassay for detecting hippuric acid based on the interaction of osmium-antigen conjugate films with antibody on screen printed carbon electrodes," *Bull. Korean Chem. Soc.*, no. 5, pp. 1485–1490, 2012.
- [125] K. Huang, X. Liu, W. Xie, and H. Yuan, "Electrochemical behavior and voltammetric determination of norfloxacin at glassy carbon electrode modified with multi walled carbon nanotubes/nafion," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, no. 64, pp. 269–274, 2008.