



Desenvolvimento de uma plataforma eletroanalítica em papel para a análise de azitromicina

TIAGO FILIPE DA COSTA OLIVEIRA MAGALHÃES

novembro de 2019

Desenvolvimento de uma plataforma eletroanalítica em papel para a análise de azitromicina

Tiago Filipe da Costa Oliveira Magalhães, 1141244

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, ramo opcional Qualidade

Orientação: Estefanía Costa Rama
Hendrikus Petrus Antonius Nouws

Centro de Investigação: Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ)

Outubro 2019

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Doutor Hendrikus Nouws, não só, por me ter dado a oportunidade de desenvolver o meu projeto no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Estágio, mas também pela disponibilidade e apoio.

Um agradecimento também à Doutora Estefanía Rama pela orientação ao longo do estágio, pelo conhecimento transmitido, pela disponibilidade e, acima de tudo, pela paciência.

À minha família eu agradeço especialmente, por todo os ensinamentos que me passaram, pelo auxílio permanente durante a minha vida toda e por todo apoio, são sem dúvida a razão pela qual eu cheguei onde estou hoje.

Por fim, agradecer, também a todos os meus amigos, pelo apoio incondicional demonstrado ao longo dos anos e, principalmente, por estarem sempre presentes.

Este trabalho foi financiado pela União Europeia e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (UEFISCDI / FORMAS) no âmbito do consórcio internacional REWATER, financiado no ERA-NET Cofund WaterWorks2015 Call. Este trabalho também foi financiado pela FCT / Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) através de fundos nacionais (UID/QUI/50006/2019).

RESUMO

Nos últimos anos, produtos farmacêuticos como antibióticos tornaram-se importantes contaminantes ambientais devido ao seu uso massivo e à sua persistência. As estações de tratamento de águas residuais (ETARs) convencionais não são eficientes na sua eliminação. Por este motivo, estes são amplamente distribuídos no ambiente e, embora sejam encontrados em concentrações muito reduzidas, a sua presença associou-se a danos à saúde humana e animal. Neste contexto fica claro a grande importância da análise de contaminantes, não só para avaliar a qualidade do ambiente, mas também para conhecer fontes de contaminantes e a sua distribuição. Os métodos mais comuns para a análise ambiental (e.g. a cromatografia) requerem instrumentação cara e complexa. Devido a mobilidade e distribuição dos contaminantes no ambiente é de elevada importância desenvolver ferramentas portáteis que permitam a sua análise de maneira rápida e *in situ*, para assim obter informação em tempo real.

Deste modo, no presente trabalho procurou-se desenvolver uma plataforma eletroanalítica miniaturizada e portátil baseada em papel para a deteção de azitromicina, que é um antibiótico amplamente prescrito para o tratamento de infeções respiratórias. O uso do papel como substrato permitiu pré-concentrar o analito (azitromicina) na própria plataforma antes de realizar a medição, melhorando a sensibilidade do método.

Depois de otimizadas as condições de pré-concentração, verificou-se que esta pré-concentração permitiu reduzir significativamente o limite de deteção (LOD): de 0,24 mM (medida direta) a 7,2 μ M (com pré-concentração). Além disso, comparativamente com elétrodos serigrafados comerciais (SPEs) a plataforma desenvolvida apresentou uma maior sensibilidade e um LOD mais baixo. Por outro lado, o uso do papel também permitiu utilizar a plataforma como armazenamento de amostras, sendo a resposta estável pelo menos até 28 dias. Finalmente, a plataforma desenvolvida foi testada com sucesso para a análise da azitromicina em solventes orgânicos. Deste modo, apresenta-se como um primeiro passo para o desenvolvimento de uma solução viável e verde para a análise rápida e descentralizada de contaminantes no ambiente.

Palavras-chave: Análise eletroquímica, Dispositivos baseados em papel, Pré-concentração, Azitromicina, Contaminantes.

ABSTRACT

In the last few years, pharmaceuticals such as antibiotics have become important environmental contaminants due to their massive use and their persistence. Conventional wastewater treatment plants are not efficient in their elimination. Subsequently, they are widely distributed in the environment and, although found at very low concentrations, their presence has been associated with damage on human and animal health. In this context, the importance of pollutant analysis is clear, not only to assess the quality of the environment, but also to understand the sources of pollutants and their distribution. The most common methods for environmental analysis (e.g. chromatography) require complex instrumentation and long analysis times. Due to the mobility and distribution of pollutants in the environment, it is very important to develop portable tools that allow rapid and *in situ* analysis of pollutants in order to obtain real time information.

Thus, in the present work the development of a paper-based, miniaturized analytical platform was pursued for the detection of azithromycin, which is an antibiotic widely prescribed for the treatment of respiratory tract infections. The use of paper as a substrate allowed the analyte (azithromycin) to be pre-concentrated on the platform itself before making the measurement in order to improve the sensitivity of the method.

After optimizing the preconcentration conditions, it was found that this preconcentration significantly reduced the detection limit (LOD): from 0.24 mM (direct measurement) to 7.2 μ M (with preconcentration). In addition, compared to commercial screen-printed electrodes (SPEs), the developed platform also presented a higher sensitivity and lower LOD. On the other hand, the use of paper also allowed the storage of samples; the response was stable for at least 28 days. Finally, the developed platform was successfully tested for azithromycin analysis in organic solvents. It is, therefore, a first step towards the development of a viable and green solution for rapid and decentralized analysis of contaminants in the environment.

Keywords: Electroanalysis, Paper-based devices, Preconcentration, Azithromycin, Contaminants.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Contaminantes Emergentes	1
1.1.1 Antibióticos como contaminantes	2
1.1.2 Azitromicina	4
1.2. Técnicas Eletroquímicas	6
1.2.1 Voltametria Cíclica e de varrimento Linear	7
1.3. Eléttodos serigrafados (<i>screen-printed electrodes</i> , SPEs)	8
1.4. Dispositivos analíticos baseados em papel	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1. Reagentes e materiais	13
2.1.1 Reagentes e materiais para a construção da plataforma baseada em papel	13
2.1.2 Reagentes e materiais comuns	13
2.1.3 Instrumentação e materiais para medidas eletroquímicas em eléctrodos serigrafados de carbono	14
2.1.4 Instrumentação e materiais para medidas eletroquímicas em papel	14
2.1.5 Outra instrumentação	14
2.2. Procedimentos	15
2.2.1. Procedimento para a construção da plataforma em papel	15
2.2.2. Procedimento para medidas eletroquímicas em SPCE	16
2.2.3. Procedimento para a pré-concentração e medidas eletroquímicas em papel	17
2.2.4. Procedimento para o desacoplamento do meio da amostra do meio para a medição voltamétrica	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1. Comportamento eletroquímico e análise da azitromicina em SPCE	21
3.2. Comportamento eletroquímico e análise da azitromicina em eléctrodos de papel	23
3.3. Pré-concentração como estratégia para a melhoria do sinal analítico	27
3.4. Análise e amostras	32

3.5. Plataforma eletroanalítica como armazenamento de amostras	32
3.6. Desacoplamento do meio da amostra do meio da medição voltamétrica	33
4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO A.....	51
ANEXO B	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Representação gráfica da mortalidade por diversas causas em 2016 e a previsão da mortalidade por resistência antibiótica para 2050, adaptado de [20].	4
Figura 1.2: Estrutura química da azitromicina.	5
Figura 1.3: Representação gráfica da variação do potencial em função do tempo na voltametria cíclica.	8
Figura 1.4: Representação gráfica de um voltamograma cíclico tipo: corrente em função do potencial.	8
Figura 1.5: Representação esquemática das tendências atuais no desenvolvimento de dispositivos analíticos.	9
Figura 1.6: Representação esquemática de um SPE.	9
Figura 1.7: Fotografia de diferentes SPE comerciais: A- elétrodo serigrafado de carbono; B- elétrodo serigrafado de ouro; C- elétrodo serigrafado de carbono com dois elétrodos de trabalho.	10
Figura 1.8: Número de publicações obtido na pesquisa pelo termo “ <i>paper-based analytical devices</i> ” no ScienceDirect entre os anos de 2010 a 2019.	11
Figura 3.1: Voltamogramas cíclicos obtidos para os SPCE em dois varrimentos consecutivos. As CVs foram efetuadas em 40 μ L de azitromicina 1,0 mM em 0,1M PB pH 7,5. Velocidade de varrimento de 50 mV/s.	21
Figura 3.2: A, B- LSVs obtidos com SPCEs para soluções de azitromicina de diferentes concentrações em 0,1M PB pH 7,5: a) 0,01 mM, b) 0,05 mM, c) 0,1 mM, d) 0,25 mM, e) 0,5 mM, f) 1,0 mM, g) 1,5 mM, h) 2,5 mM. Velocidade de varrimento de 50 mV/s. C, D- Faixas lineares da curva de calibração obtida representando a intensidade da corrente de pico para cada concentração de azitromicina.	22
Figura 3.3: Voltamogramas cíclicos obtidos para os elétrodos de papel em dois varrimentos consecutivos. As CVs foram efetuadas em 10 μ L de azitromicina 0,5 mM em 0,1 M PB pH 7.5. Velocidade de varrimento de 50 mV/s.	24
Figura 3.4: CVs obtidos para elétrodos de papel e SPCE, para uma solução de azitromicina 0,1 mM em 0,1M PB pH 7,5. Velocidade de varrimento de 50 mV/s.	25

Figura 3.5: A- LSVs obtidas em elétrodos de papel para soluções de azitromicina de diferentes concentrações em 0,1 M PB pH 7,5: a) 0,25 mM, b) 0,5 mM, c) 0,75 mM, d) 1,0 mM, e) 2,5 mM. Velocidade de varrimento de 50 mV/s. B- Faixa linear da curva de calibração obtida representando a intensidade da corrente do pico para cada concentração de azitromicina. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medições... 26

Figura 3.6: Voltamogramas cíclicos obtidos para os elétrodos de papel utilizando diferentes volumes de pré-concentração azitromicina de 0,5 mM). Velocidade de varrimento de 50 mV/s. 27

Figura 3.7: Representação gráfica da intensidade de corrente do pico para cada volume utilizado na pré-concentração e temperatura de secagem. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições. 28

Figura 3.8: A, B- LSVs obtidos com elétrodos de papel para soluções em PB 0,1 M pH 7,5 depois de pré-concentradas soluções de azitromicina de diferentes concentrações: a) 0,005 mM, b) 0,0075 mM, c) 0,01 mM, d) 0,025 mM, e) 0,05 mM, f) 0,1 mM, g) 0,25 mM, h) 0,5 mM, i) 0,75 mM, j) 1,0 mM. Velocidade de varrimento de 50 mV/s. C, D- Faixas lineares da curva de calibração obtida representando a intensidade da corrente de pico para cada concentração de azitromicina. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de cinco medições..... 30

Figura 3.9: Representação gráfica da intensidade de corrente do pico ao longo do tempo e às temperaturas de armazenamento estudadas. As medições foram efetuadas em 0,1M PB pH 7,5, depois de pré-concentrados 20 μ L de uma solução aquosa de azitromicina 0,05 mM. Velocidade de varrimento de 100 mV/s. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições. 33

Figura 3.10: Voltamograma cíclico obtido para os elétrodos de papel. As CVs foram efetuadas em 10 μ L de 0,1M PB pH 7,5 depois de pré-concentrados 20 μ L de azitromicina 1,0 mM em metanol. Velocidade de varrimento de 100 mV/s..... 34

Figura 3.11: Representação gráfica da intensidade de corrente do pico anódico para cada volume de pré-concentração. As medições foram efetuadas em 0,1M PB pH 7,5, depois de pré-concentrados diferentes volumes de uma solução azitromicina 0,5 mM em metanol. Velocidade de varrimento de 100 mV/s. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições. 35

Figura 3.12: A, B- LSVs obtidos com elétrodos de papel em PB 0,1 M pH 7,5, depois de pré-concentrados 20 μ L de azitromicina em metanol de diferentes concentrações: a) 0,05 mM, b) 0,25 mM, c) 0,5 mM, d) 0,75 mM, e) 1,0 mM, f) 1,5 mM, g) 2,5 mM, h) 5,0 mM. Velocidade de varrimento de 50 mV/s. C, D- Faixas lineares da curva de calibração obtida representando a intensidade da corrente de pico para cada concentração de azitromicina. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medições. 36

Figura 3.13: Voltamograma cíclico obtido para os elétrodos de papel. As CVs foram efetuadas em 10 μ L de 0,1M PB pH 7,5 depois de pré-concentrados 20 μ L de azitromicina 1,0 mM em acetonitrilo. Velocidade de varrimento de 100 mV/s. 38

Figura 3.14: Representação gráfica da intensidade do pico anódico para cada volume de pré-concentração. As medições foram efetuadas em 0,1M PB pH 7,5, depois de pré-concentrados diferentes volumes de uma solução azitromicina 0,5 mM em acetonitrilo. Velocidade de varrimento de 100 mV/s. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições. 39

Figura 3.15: A - LSVs obtidos com elétrodos de papel em PB 0,1 M pH 7,5, depois de pré-concentrados 20 μ L de azitromicina em acetonitrilo de diferentes concentrações: a) 0,05 mM, b) 0,25 mM, c) 0,5 mM, d) 0,75 mM, e) 1,0 mM, f) 1,5 mM, g) 2,5 mM. Velocidade de varrimento de 50 mV/s. B- Faixa linear da curva de calibração obtida representando a intensidade da corrente de pico para cada concentração de azitromicina. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medições. 40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Registo dos parâmetros referentes ao tratamento estatístico das curvas da calibração da Figura 3.2.....	23
Tabela 3.2: Registo dos parâmetros referentes ao tratamento estatístico da curva da calibração da Figura 3.5.....	26
Tabela 3.3: Registo dos tempos de secagem aproximados, em horas, para cada volume de pré-concentração e temperatura de secagem.	29
Tabela 3.4: Registo dos parâmetros referentes ao tratamento estatístico das curvas da calibração da Figura 3.8.....	31
Tabela 3.5: Registo das concentrações teórica e obtida e do desvio relativo para cada uma das amostras reais.	32
Tabela 3.6: Registo dos parâmetros referentes ao tratamento estatístico das curvas da calibração das Figuras 3.12.	37
Tabela 3.7: Registo dos parâmetros referentes ao tratamento estatístico da curva da calibração da Figura 3.15.....	40
Tabela A.1: Registo intensidade do pico anódico das LSVs obtidas para cada concentração de azitromicina usando SPCEs.....	51
Tabela A.2: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina usando elétrodos de papel.....	51
Tabela A.3: Registo dos volumes de pré-concentração e temperatura de secagem e respetivas médias da intensidade do pico anódico, desvio padrão e desvio padrão relativo para 3 réplicas efetuadas, para a concentração de 0,050 mM de azitromicina.....	52
Tabela A.4 Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 5 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina pré-concentrada usando elétrodos de papel, para a zona de baixas concentrações.....	52
Tabela A.5: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 5 réplicas efetuadas para cada concentração de	

azitromicina pré-concentrada usando elétrodos de papel, para a zona de altas concentrações.....	53
Tabela A.6: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para volume de solução de azitromicina 1,0 mM pré-concentrada em metanol, usando elétrodos de papel.....	53
Tabela A.7: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina pré-concentrada em metanol, usando elétrodos de papel, para a zona de baixas concentrações.	53
Tabela A.8: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina pré-concentrada em metanol, usando elétrodos de papel, para a zona de altas concentrações.....	54
Tabela A.9: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para volume de solução de azitromicina 0,50 mM pré-concentrada em acetonitrilo, usando elétrodos de papel.	54
Tabela A.10 Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina pré-concentrada em acetonitrilo, usando elétrodos de papel.....	54

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

μ PADs	Dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (<i>microfluidic paper-based analytical devices</i>)
AE	Eléctrodo auxiliar (<i>auxiliary electrode</i>)
AZI	Azitromicina
CV	Voltametria cíclica (<i>cyclic voltammetry</i>)
DMF	N,N-dimetilformamida
EC	Contaminante emergente (<i>emerging contaminant</i>)
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
GC	Cromatografia gasosa (<i>gas chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
LC	Cromatografia líquida (<i>liquid chromatography</i>)
LSV	Voltametria de varrimento linear (<i>linear sweep voltammetry</i>)
MS	Espectrometria de massa (<i>mass spectrometry</i>)
RE	Eléctrodo de referência (<i>reference electrode</i>)
SPCE	Eléctrodo serigrafado de carbono (<i>screen-printed carbon electrode</i>)
SPE	Eléctrodo serigrafado (<i>screen-printed electrode</i>)
S_{x0}	Desvio padrão do método
T_A	Temperatura ambiente
WE	Eléctrodo de trabalho (<i>working electrode</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contaminantes Emergentes

O desenvolvimento da indústria contribuiu diretamente para melhorar o estilo de vida, mas, ao mesmo tempo, comprometeu a qualidade do ambiente. O consumo e uso exacerbado, por parte da humanidade, dos mais variados produtos (por exemplo, alimentos, têxteis, fármacos, etc.), leva à libertação de grandes quantidades de poluentes, como pesticidas, tintas, hidrocarbonetos do petróleo, metais pesados e fármacos. Devido às características de difícil degradação e alta toxicidade, a maioria destes contaminantes podem causar efeitos prejudiciais à sustentabilidade ambiental e à saúde humana [1, 2]. No que diz respeito à fauna e flora da biosfera, os poluentes estão diretamente ligados a morte de várias espécies aquáticas, nomeadamente, moluscos, peixes, aves marinhas ou crustáceos [3, 4].

Num grupo mais restrito de contaminantes existem os conhecidos como contaminantes emergentes (*emerging contaminants*, ECs). Os ECs são substâncias que anteriormente não eram detetadas ou surgiam em concentrações reduzidas e que recentemente são detetadas em concentrações superiores (usualmente na ordem das microgramas ou nanogramas por litro) [5, 6]. O desenvolvimento das técnicas analíticas contribuiu para a deteção, cada vez mais eficiente, de contaminantes emergentes em menores concentrações. Os ECs englobam uma série de categorias de substâncias químicas, nomeadamente, fármacos, produtos de cuidado pessoal, pesticidas, plastificantes e retardadores de chama [6, 7].

Os efeitos destes ECs em muitos casos ainda não são conhecidos. No entanto, efetuaram-se estudos que relacionam a presença de fármacos (como por exemplo o diclofenac), com efeitos nocivos para várias espécies de animais, como por exemplo abutres [8]. No que diz respeito a pesticidas, o contacto com este tipo de substâncias está relacionado com problemas graves para a saúde humana, como problemas neurológicos e reprodutores e, em alguns casos, com o desenvolvimento de cancro [9, 10].

A principal via de entrada dos ECs no meio ambiente são as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), pelo facto de não estarem preparadas para a eliminação deste tipo de resíduos. Normalmente, os efluentes das ETARs são lançados em águas superficiais e, assim posteriormente, os contaminantes ficam retidos em águas

subterrâneas, e dependendo da sua persistência e mobilidade no ambiente água-solo, podem chegar ao mar e, também, a águas de consumo [11, 12].

A ineficiência e ineficácia das ETARs no tratamento e remoção destas substâncias juntamente com os riscos que apresentam para a fauna, flora e saúde humana, fazem da detecção de ECs um assunto de extrema importância. [4, 12].

Na detecção dos ECs o método mais comum utilizado é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um espectrómetro de massa (MS). Ainda que esta técnica apresente alta sensibilidade na quantificação de variadas substâncias, apresenta diversas limitações. Essas limitações passam pela utilização de grandes e complexos equipamentos que requerem elevados volumes de reagentes, o que resulta em grandes volumes de resíduos, ou pela necessidade tanto de analistas qualificados no manuseamento do equipamento como de um grande investimento na aquisição da instrumentação requerida [13, 14]. Assim, atualmente existe uma procura constante para métodos mais simples, baratos e sustentáveis que permitam a sua aplicação *in situ* [15].

1.1.1 Antibióticos como contaminantes

Nos últimos anos, a preocupação da contaminação dos solos e aquíferos por parte de vários tipos de fármacos tem crescido bastante. Hoje em dia, os fármacos são administrados extensivamente, tanto em animais como em humanos, e, aquando da sua absorção, são libertados em águas residuais [16]. Este uso massivo está relacionado com o aumento da presença de fármacos, os seus metabolitos e produtos de degradação no ambiente. Como para os restantes ECs, a maior fonte de entrada dos fármacos no ambiente aquático são as estações de tratamento de água agrícolas e municipais. A principal rota dos antibióticos é a ingestão, seguida da excreção e libertação no esgoto através da urina e fezes [6]. As águas residuais são tratadas nas ETARs mas, como foi dito anteriormente, os tratamentos convencionais dessas estações não conseguem a remoção completa dos fármacos presentes. Assim, a entrada deste tipo de compostos, bem como os seus metabolitos, no ambiente fica facilitada. Além disso, fármacos utilizados em medicina veterinária são excretados no estrume que, mais tarde, é aplicado como fertilizante, o que contribuiu para a sua disseminação no ambiente. [16].

Dentro dos fármacos, os antibióticos são especialmente importantes como ECs dado que a sua introdução e persistência no ambiente contribui para a expansão da

resistência aos antibióticos. Um antibiótico é entendido como um agente que elimina ou inibe o crescimento de microrganismos, nomeadamente, bactérias. A sua atividade biológica seletiva contra outro tipo de microrganismos, bem como a sua baixa toxicidade permite a destruição de micróbios no interior de outros organismos [17, 18]. Nos primórdios da descoberta dos antibióticos, estes eram de origem natural, por exemplo a penicilina era extraída do genoma de um fungo, *Penicillium*. Atualmente, muitos dos antibióticos são produzidos a partir de síntese química ou por modificação química de compostos de origem natural [18, 19].

A descoberta dos antibióticos foi um dos avanços mais importantes na medicina no século 20. A sua utilização contribuiu para o decréscimo acentuado da mortalidade e morbidade de doenças como a tuberculose, sífilis e doenças gastrointestinais [7, 17].

Apesar do aparecimento dos antibióticos ter sido revolucionário, atualmente, o seu uso excessivo e a sua persistência tornou os antibióticos como um dos contaminantes mais preocupantes devido aos efeitos nocivos para a fauna e também devido a sua contribuição para o desenvolvimento da resistência antibiótica [7].

A resistência antibiótica é uma adaptação genética adquirida por subpopulações de bactérias que lhes permite sobreviver e crescer na presença de um agente antibiótico que normalmente as inibiria ou destruiria. Ainda que se trate de um fenómeno natural, o problema da resistência antibiótica é causado, principalmente, pela utilização excessiva e inapropriada dos antibióticos. Ainda assim, como já foi mencionado, este problema é agravado pelo facto dos antibióticos e os seus metabolitos poderem, também, chegar a ambientes aquáticos através da descarga direta dos efluentes das ETARs, dos lixiviados de áreas agrícolas e outro tipo de descargas [7].

Atualmente, estima-se que esta adaptação genética causa a morte de 700 mil pessoas por ano, sendo que a previsão é que, em 2050, este número aumente para 10 milhões (Figura 1.1) [5, 18, 20]. No que diz respeito ao impacto financeiro, a resistência antibiótica poderá provocar o decréscimo acentuado do Produto Interno Bruto (PIB) de todos os países do mundo na ordem dos milhares de bilhões de euros. Isto deve-se ao facto da resistência antibiótica aumentar tanto os cuidados de saúde como o tempo de internamento em hospitais, o que se traduz em custos adicionais [7, 21, 22].

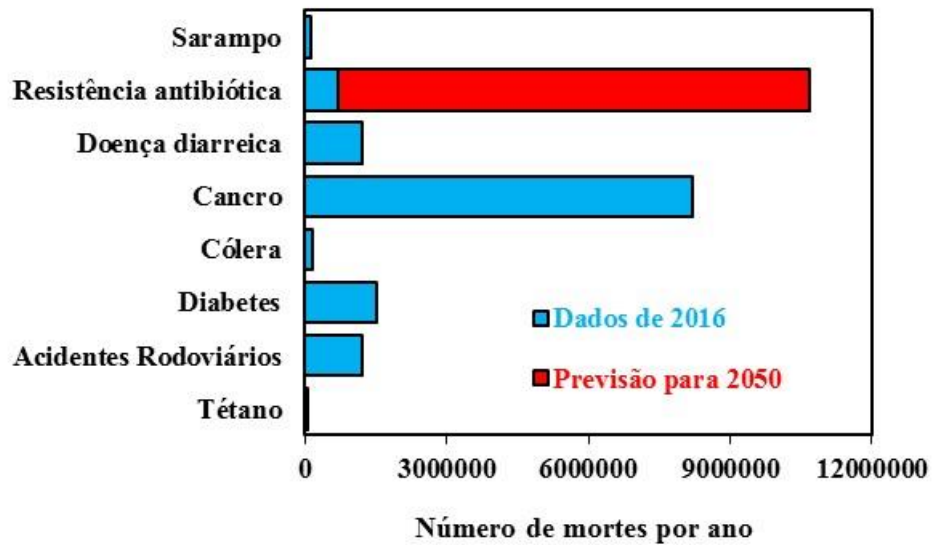


Figura 1.1: Representação gráfica da mortalidade por diversas causas em 2016 e a previsão da mortalidade por resistência antibiótica para 2050, adaptado de [20].

Para além dos problemas para a saúde humana, a resistência antibiótica causa problemas a nível da ecotoxicidade nos ecossistemas aquáticos, na medida em que a presença de antibióticos perturba a ação dos principais produtores e decompositores do ecossistema, que são essenciais à sustentabilidade deste meio [7, 23].

Devido a todos estes fatores, é possível concluir que a deteção dos antibióticos é extremamente importante. Assim, verifica-se a necessidade da deteção destas espécies em variadas matrizes (por exemplo, águas residuais, de superfície, subterrâneas, para consumo e do mar) para avaliar a qualidade das águas e da eficiência e eficácia das ETARs, mas também para melhorar o conhecimento atual da origem, destino e efeitos dos ECs no ambiente [6, 18].

1.1.2 Azitromicina

A azitromicina é um antibiótico semissintético que deriva da eritromicina, por isso apresenta um mecanismo de ação similar, que consiste na inibição da síntese proteica das bactérias [5, 6]. A estrutura química do composto está apresentada na Figura 1.2.

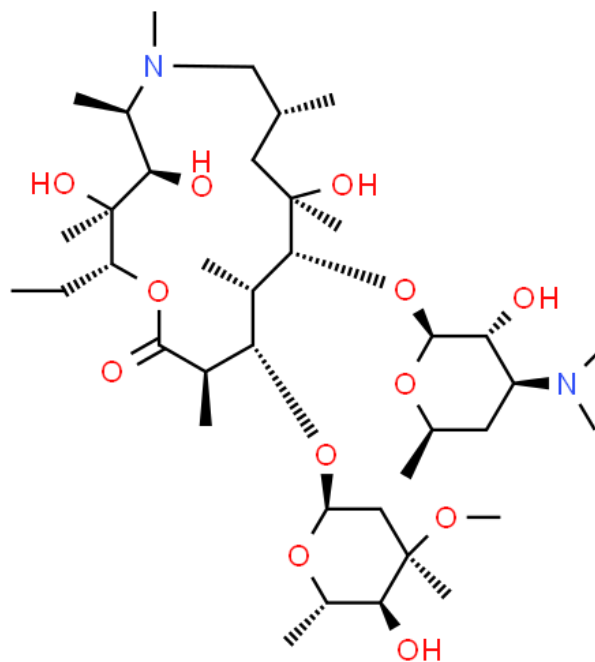


Figura 1.2: Estrutura química da azitromicina.

A azitromicina é indicada para o tratamento de diversas infeções bacterianas, como por exemplo a clamídia, e infeções do trato respiratório inferior, incluindo a bronquite e pneumonia devido às suas propriedades imunomodulatórias [24, 25].

De um ponto de vista ambiental, a deteção da azitromicina é importante devido aos riscos associados à sua presença na rede hídrica, na medida em que, tal como outros antibióticos, pode constituir uma ameaça à sobrevivência do ecossistema devido à possível disseminação da resistência antibiótica. Deste modo, é importante perceber a disposição da azitromicina nas águas residuais, não só para conhecer a qualidade da água, mas também para se obterem tratamentos mais eficazes na remoção deste antibiótico e, assim, reduzir-se-ia a quantidade libertada no ambiente [26].

Para a determinação da azitromicina é comum recorrer-se a métodos baseados em HPLC-MS. Ainda que se tratem de métodos muito robustos e sensíveis, estes apresentam várias desvantagens, como o investimento de capital considerável nos equipamentos e a necessidade de operadores qualificados para o manuseamento do equipamento e o uso de elevadas quantidades de reagentes [13]. Deste modo, os dispositivos eletroquímicos apresentam-se como uma interessante alternativa devido à sua simplicidade, baixo custo, facilidade de manuseamento e de miniaturização, o que se traduz num consumo baixo de

reagentes e de amostra. Assim, são portáteis e capazes de realizar análises rápidas sem que seja necessário, praticamente, um pré-tratamento das amostras. [27, 28]. Além disso, são métodos mais sustentáveis comparativamente com os convencionais como o HPLC-MS, pois as técnicas eletroquímicas podem-se considerar como verdes por vários motivos: i) utiliza eletrões como um reagente barato e não poluente; ii) a maioria das reações podem ser realizadas à temperatura ambiente, evitando consumos acrescidos de energia associados ao controlo da temperatura; iii) envolve operações em meios de baixa volatilidade, o que reduz a libertação de solventes orgânicos na atmosfera [29].

Apesar dos motivos já apresentados, os exemplos na bibliografia de sensores eletroquímicos para azitromicina são escassos, por isso, neste trabalho desenvolveu-se um dispositivo eletroanalítico para a análise de azitromicina.

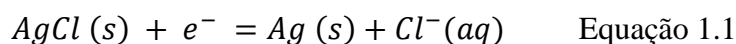
1.2. Técnicas Eletroquímicas

A eletroquímica é um ramo da química que relaciona parâmetros elétricos com mudanças químicas. As técnicas eletroquímicas dinâmicas (e.g. voltametria e amperometria) são as mais utilizadas para a identificação e determinação de espécies químicas. Estas baseiam-se em processos produzidos pela aplicação de uma excitação externa que causa uma reação eletroquímica num sentido concreto: consome-se os reagentes gerando-se produtos mediante uma transferência eletrónica na interface eléctrodo-solução. Numa reação eletroquímica redox, os processos são a oxidação e a redução. Na oxidação a espécie eletroativa cede eletrões ao eléctrodo, enquanto que na redução é o eléctrodo que fornece eletrões à espécie eletroativa. As diferentes possibilidades no tipo e na magnitude da excitação explicam a variedade de técnicas eletroquímicas existentes [30, 31]. Dentro desse conjunto de técnicas, as medidas eletroquímicas do presente trabalho tiveram como base a voltametria.

Os componentes básicos necessários para se realizar uma análise voltamétrica são a célula eletroquímica e o circuito eletrónico que controla e mede a corrente ou o potencial de acordo com a técnica eletroquímica aplicada (potencióstato). A célula eletroquímica mais utilizada inclui três tipos de eléctrodos: o eléctrodo de trabalho (*working electrode*, WE), o de referência (*reference electrode*, RE) e o auxiliar (*auxiliary electrode*, AE). O primeiro é onde a reação eletroquímica ocorre. O de referência proporciona um potencial estável contra o qual é comparado o potencial do eléctrodo de trabalho. O eléctrodo auxiliar

surge na necessidade de evitar uma diminuição do potencial aplicado (queda óhmica), pois parte do potencial é necessário para atravessar a solução. Assim, ao incluir um AE, a corrente eletrolítica flui entre o WE e o AE, enquanto a diferença de potencial é controlada face ao RE, melhorando a estabilidade experimental do RE [32].

Normalmente, escolhe-se um material inerte para o AE, por exemplo um fio de platina [33]. O WE pode ser de metal (por exemplo, ouro, platino ou prata), de carbono (por exemplo, pasta de carbono, carbono pirolítico ou carbono vítreo) ou de materiais semicondutores (como silício) e pode apresentar diferentes geometrias [33]. Quanto ao RE, o mais utilizado é o elétrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) que se baseia na reação redox:



O RE típico consiste num fio de prata anodizado com uma fina camada de AgCl e é submergido numa solução saturada de cloreto de potássio onde um tampão poroso atua como ponte salina [33].

1.2.1 Voltametria Cíclica e de varrimento Linear

A voltametria, de um modo geral baseia-se na medida da corrente gerada quando se realiza um varrimento do potencial. Assim resulta um voltamograma, que é um gráfico da intensidade da corrente medida em função do potencial aplicado [30].

A voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*, CV) é a técnica eletroquímica mais utilizada para o estudo dos processos de oxidação-redução e para caracterizar o comportamento de um analito. Neste tipo de voltametria o potencial é variado, primeiro no sentido direto, desde um potencial inicial E_0 até um potencial final E_1 e, de seguida, no sentido inverso, desde E_1 até E_2 (que costuma ser igual a E_0), tal como se mostra na Figura 1.3. O declive, que corresponde à variação do potencial com o tempo é a velocidade de varrimento (v). A voltametria de varrimento linear difere da cíclica na medida em que o varrimento é feito apenas no sentido direto [34].

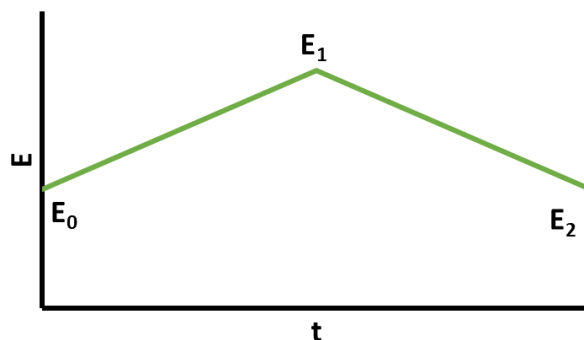


Figura 1.3: Representação gráfica da variação do potencial em função do tempo na voltametria cíclica.

Os parâmetros mais importantes num voltamograma cíclico (Figura 1.4) são os potenciais dos picos anódico ou de oxidação (E_{pa}) e catódico ou de redução (E_{pc}) e as intensidades de corrente dos picos correspondentes, i_{pa} e i_{pc} [30, 34].

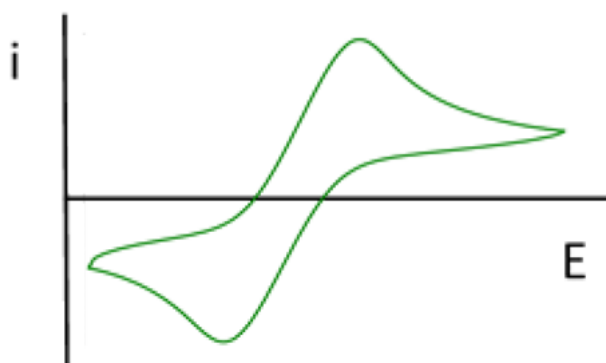


Figura 1.4: Representação gráfica de um voltamograma cíclico tipo: corrente em função do potencial.

1.3. Eléttodos serigrafados (screen-printed electrodes, SPEs)

Atualmente, a tendência no desenvolvimento de dispositivos analíticos consiste em obter dispositivos cada vez mais baratos, simples, miniaturizados e automatizados (Figura 1.5). Estas 4 características estão interligadas entre si. A miniaturização, que remonta para a redução das dimensões dos equipamentos utilizados, juntamente com a simplificação, que visa a redução da dificuldade do processo analítico, permitem uma maior automatização da análise. Por sua vez, esta automatização resulta na diminuição da intervenção humana nas análises e, por tanto, os erros imputados desta intervenção. Todas estas características permitem a diminuição dos custos da análise [35, 36].

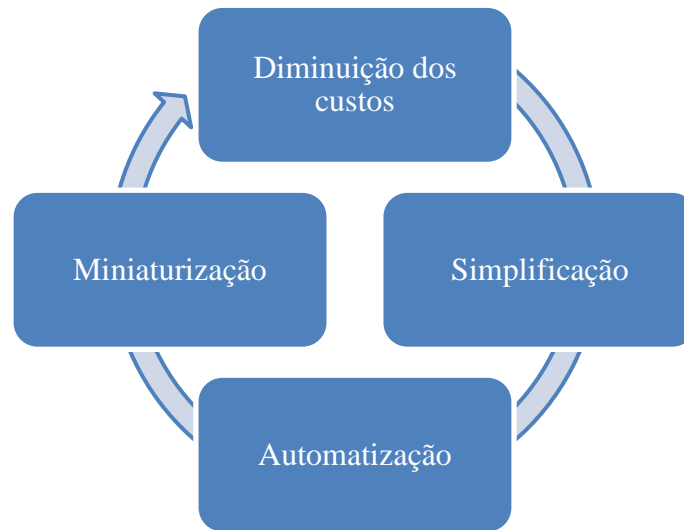


Figura 1.5: Representação esquemática das tendências atuais no desenvolvimento de dispositivos analíticos.

Neste sentido, foram desenvolvidos os elétrodos serigrafados (SPE). Estes são plataformas, normalmente de cerâmica, papel ou plástico, que contêm, uma ou mais células eletroquímicas serigrafadas. Cada célula eletroquímica pode apresentar uma configuração típica de três elétrodos constituída pelos elétrodos de referência (RE), auxiliar (CE) e de trabalho (WE), como se verifica na Figura 1.6 [37].

Célula Eletroquímica:

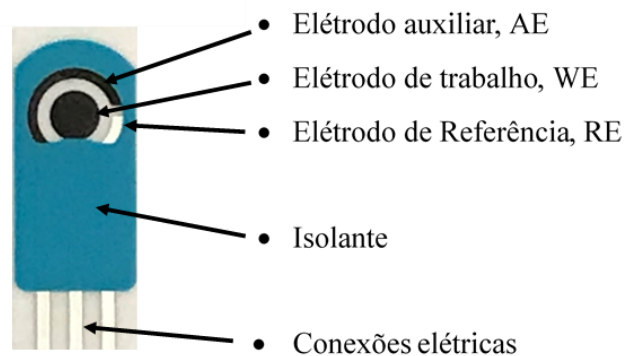


Figura 1.6: Representação esquemática de um SPE.

A tecnologia para a produção destes elétrodos surgiu nos anos 90 e tem sido cada vez mais utilizada para a produção em massa de elétrodos de baixo custo e de baixas

dimensões. Isto acontece devido às suas boas características eletroanalíticas, à flexibilidade de desenho, à possibilidade de incorporação em sistemas portáteis e à simplicidade no manuseamento [38].

O processo de fabrico dos SPE pode ser modificado de modo a responder às diferentes necessidades, no entanto, existem algumas etapas básicas que são transversais. Primeiramente é necessário escolher o material do substrato, isto depende, por exemplo, da aplicação pretendida, da temperatura de manuseamento ou do solvente a utilizar. Posto isto, os materiais mais comuns são o polivinilcarbonato, o poliéster ou a alumina, sendo que o polivinilcarbonato apresenta melhores resultados no que diz respeito a solventes aquosos, enquanto que o poliéster é recomendado em solventes orgânicos [39]. De seguida é desenhada e produzida a tela que é utilizada no processo de fabrico e que define a geometria e tamanho do eléctrodo final. Finalmente, é definida a grossura do filme de tinta e é então depositada a tinta [38]. O tipo de tinta a que se pode recorrer depende das propriedades químicas e físicas requeridas, desde a viscosidade, condutividade ou resistência térmica (por exemplo, prata, platina, ouro ou carbono). A tinta mais comum é a de carbono devido ao seu baixo custo e ao facto de ser quimicamente inerte [40]. Na Figura 1.7 mostra-se alguns desenhos de SPE comerciais.

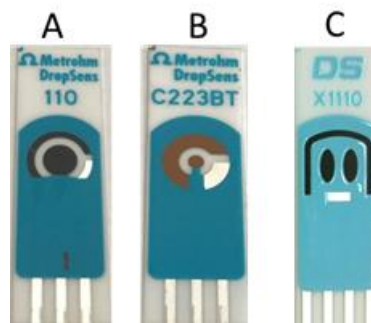


Figura 1.7: Fotografia de diferentes SPE comerciais: A- eléctrodo serigrafado de carbono; B- eléctrodo serigrafado de ouro; C- eléctrodo serigrafado de carbono com dois eléctrodos de trabalho.

A grande versatilidade dos SPE reside na facilidade de customizar o seu desenho segundo as necessidades da análise (Figura 1.7) e também na facilidade da sua modificação com diversos materiais, por exemplo nanomateriais (para aumentar a área do WE e melhorar a transferência de eletrões), biomoléculas (enzimas, anticorpos, ADN), mediadores redox, entre outros. [41, 42].

1.4. Dispositivos analíticos baseados em papel

Nas últimas décadas, verificou-se que o papel é um material interessante para a construção de dispositivos analíticos. Ainda que o papel tenha sido empregue em análises há muito tempo (exemplos muito conhecidos são os testes de gravidez), a partir de 2007 o interesse por este material como substrato para plataformas analíticas aumentou com a introdução dos dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (*microfluidic paper-based analytical devices*, μ PADs) [43, 44]. Tanto é assim que atualmente o desenvolvimento de dispositivos de análise baseados em papel pode ser considerado uma importante área de investigação [45-48].

O papel apresenta várias vantagens únicas quando comparado com os materiais tradicionais, incluindo o transporte de fluido sem que seja necessária energia devido à ação capilar do papel e a elevada razão entre a área de superfície e o volume (devido à porosidade). Para além disso, o papel é muito barato, flexível, fácil de armazenar e transportar e inflamável, o que faz com que a sua eliminação seja simples e segura [46, 49, 50].

Estes fatores explicam o grande desenvolvimento e fabrico, nos últimos anos, de dispositivos eletroanalíticos baseados em papel, como se mostra na Figura 1.8, para aplicação em diferentes áreas como clínica, alimentar ou ambiental [15, 47, 51-53].

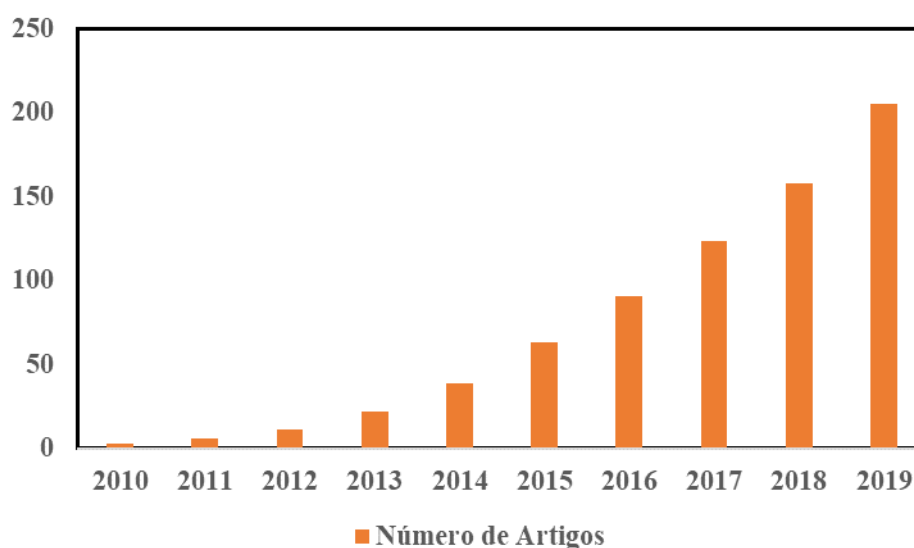


Figura 1.8: Número de publicações obtido na pesquisa pelo termo “*paper-based analytical devices*” no ScienceDirect entre os anos de 2010 e 2019.

As técnicas de deteção que se utilizam nos μ PADs são diversas: principalmente óticas (por exemplo, colorimétricas), eletroquímicas e (eletro)quimioluminescentes. As técnicas eletroquímicas são adequadas na deteção neste tipo de dispositivos devido a vários fatores como: i) os elétrodos podem ser facilmente miniaturizados e integrados nestes dispositivos; ii) não é requerida instrumentação complexa; iii) requerem baixo volume de amostra; iv) existem potencióstatos portáteis no mercado, o que possibilita análises *in situ* [43].

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma plataforma analítica, baseada em papel, para a deteção de azitromicina em amostras ambientais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e materiais

Os reagentes e materiais utilizados ao longo do decurso das atividades experimentais foram divididos de acordo com os estudos efetuados e, por fim, apresentam-se os reagentes comuns a todas as atividades.

2.1.1 Reagentes e materiais para a construção da plataforma baseada em papel

Os materiais e reagentes para a construção da plataforma eletroanalítica em papel, cujo procedimento de construção é explicado na secção 2.3.1, foram os seguintes:

- Pasta de carbono (Gwent Group);
- N,N-dimetilformamida (DMF) (VWR International);
- Impressora de cera ColorQube 8570 (XEROX);
- Papel cromatográfico Whatman™ grade 1;
- Conector padrão com um dos lados banhados a ouro (Digikey) com 36 pinos.

2.1.2 Reagentes e materiais comuns

Ao longo de toda a atividade experimental foi necessária a utilização de água ultrapura, com resistividade 18,2 MΩ.cm, que foi obtida através de um sistema de purificação de água da Millipore (Simplicity 185).

O fármaco em estudo na atividade laboratorial foi a azitromicina di-hidratada, que foi adquirida à Sigma-Aldrich.

As soluções tampão necessárias para os ensaios efetuados foram as seguintes:

- 0,1 M de tampão fosfato (PB), pH 7,5;
- Soluções tampão Britton-Robinson de diversos valores de pH;
- Metanol (Merck);
- Acetonitrilo (Merck);

Outro material necessário ao longo do trabalho foi:

- Tubos Eppendorf;
- Material de vidro classe A.

2.1.3 Instrumentação e materiais para medidas eletroquímicas em eléctrodos serigrafados de carbono

A instrumentação e materiais necessários para as medidas eletroquímicas em eléctrodos serigrafados de carbono (*screen-printed carbon electrodes*, SPCEs) são os seguintes:

- Potencióstato (Metrohm-Autolab, PGSTAT204) controlado pelo programa NOVA 1.11;
- Eléctrodos serigrafados de carbono (SPCEs) da DropSens [54]. Os SPCEs utilizados apresentam três eléctrodos (WE, RE, CE) serigrafados sobre um substrato cerâmico de dimensões 3,4 x 1,0 x 0,05 cm. Os contactos eléctricos e o RE são feitos de tinta de prata. Os WE e CE são feitos de tinta de carbono, sendo que o primeiro apresenta uma forma circular com um diâmetro de 4 mm;
- Conector para ligação entre o SPCE e o potencióstato também da DropSens (Figura 2.6).

2.1.4 Instrumentação e materiais para medidas eletroquímicas em papel

A instrumentação e materiais necessários para as medidas eletroquímicas são os seguintes:

- Potencióstato (Metrohm-Autolab, PGSTAT204) controlado pelo programa NOVA 1.11;
- Cabo conector standard de 3 pinos Dupont (ver secção 2.2.3).

2.1.5 Outra instrumentação

Durante a realização deste trabalho foi utilizada a seguinte instrumentação:

- Banho de Ultrassons (Bandelin Sonorex Digital 10P);
- Potenciómetro (Crison 2002);
- Balança analítica com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo);
- Estufa (JP Selecta);
- Placa de aquecimento portátil com conexão USB;
- Micropipetas eppendorf de 10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L e 5000 μ L.

2.2. Procedimentos

2.2.1. Procedimento para a construção da plataforma em papel

O procedimento para a construção da plataforma eletroanalítica em papel foi o seguinte:

- Imprimir o padrão preestabelecido em papel cromatográfico, na impressora de cera, deixando padrões circular de 4 milímetros, como se pode verificar na Figura 2.1.



Figura 2.1: Papel cromatográfico impresso.

- Difundir a cera no papel cromatográfico usando uma placa de aquecimento. Deixar o papel a 100 °C durante 1 minuto, ficando com o aspeto que se pode visualizar na Figura 2.2.

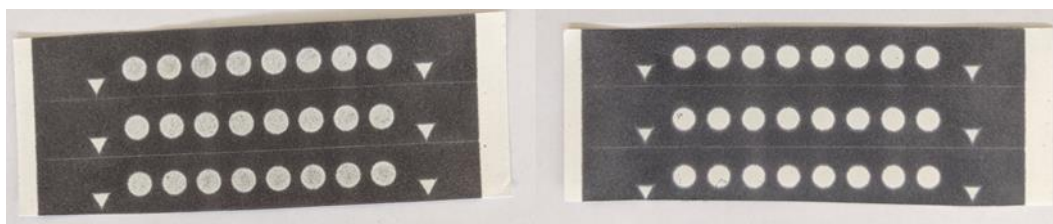


Figura 2.2: Fotografia do papel cromatográfico impresso e difundido, no lado superior (esquerda) e inferior (direita) do papel.

- Preparar uma tinta de carbono, que consiste numa mistura de 40%, em massa, de pasta de carbono em DMF;
- Levar a tinta de carbono ao banho de ultrassons durante 1 hora;

- Colocar 2 μL da tinta de carbono em cada um dos padrões circulares do papel cromatográfica, como se verifica na Figura 2.3;

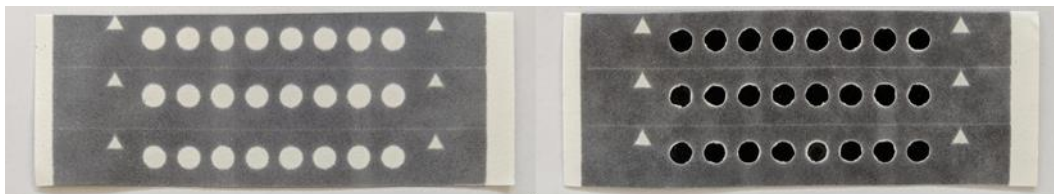


Figura 2.3: Fotografia do papel cromatográfico, no lado superior (esquerda) e inferior (direita) do papel, depois de adicionada a tinta de carbono em cada um dos padrões circulares.

- Partir 3 pinos do conjunto de 36. Dobrar os pinos conetores de modo a encaixar os dois pinos exteriores no lado superior do papel e o pino médio na parte inferior, tal como se pode visualizar nas Figuras 2.4 e 2.5.



Figura 2.4: Forma do conjunto de pinos (esquerda) e forma dos três pinos que possibilitam a medida eletroquímica (direita).

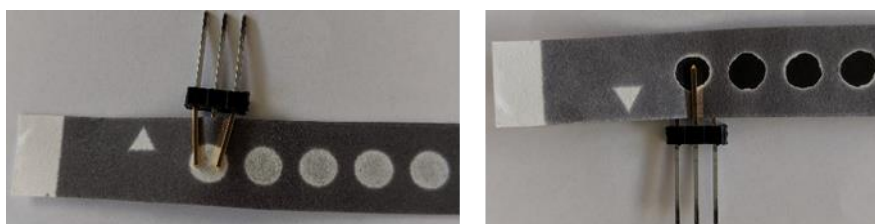


Figura 2.5: Forma do conetor de modo a possibilitar a medida eletroquímica, no lado superior (esquerda) e inferior (direita) do papel.

2.2.2. Procedimento para medidas eletroquímicas em SPCE

O procedimento das medições voltamétricas no SPCE foi o seguinte:

- Colocar 40 μL da solução de trabalho no eléctrodo serigrafado, de modo a que todos os eléctrodos (AE, RE e WE) estejam cobertos pelo líquido, sem que as conexões eléctricas se molhem.
- Inserir o SPCE no cabo de ligação ao potencióstato (Figura 2.6).



Figura 2.6: Fotografia do SPCE inserido do cabo conector, de modo a possibilitar a medição voltamétrica.

- Efetuar a medição voltamétrica.

As técnicas eletroquímicas usadas foram a voltametria de varrimento linear (*linear sweep voltammetry*, LSV) e a voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*, CV). Os parâmetros em cada caso foram os seguintes:

LSV: varrimento desde +0,2V até +1,2V, com uma velocidade de varrimento de 50 ou 100 mV/s.

CV: varrimento desde +0,2V até +1,2V, com uma velocidade de varrimento de 50 ou 100 mV/s.

Entre cada leitura é necessária utilizar um SPCE diferente e repetir o procedimento.

2.2.3. Procedimento para a pré-concentração e medidas eletroquímicas em papel

No que diz respeito à pré-concentração das amostras recorreu-se ao seguinte procedimento:

- Adicionar um determinado volume de solução de antibiótico (em água), ou de amostra no eléctrodo de trabalho, do lado contrário ao da tinta de carbono;
- Deixar secar completamente, seja à temperatura ambiente ou a diferentes temperaturas, dependendo do ensaio, utilizando uma estufa ou uma placa de aquecimento portátil (Figura 2.7).



Figura 2.7: Fotografia da placa de aquecimento portátil utilizada na pré-concentração.

Quanto às medições voltamétricas, o procedimento aplicado foi:

- Inserir o papel no conector de 3 pinos, tal como indicado na Figura 2.5;
- Inserir a plataforma no conector Dupont, como se pode visualizar na Figura 2.8;

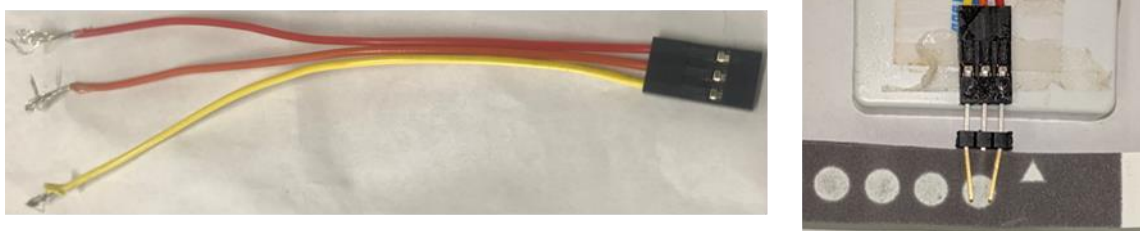


Figura 2.8: Fotografia do cabo de ligação ao potencióstato (esquerda) e exemplo da inserção da plataforma no conector (direita).

- Adicionar 10 μL de solução de antibiótico (em padrão) ou de PB, dependendo do estudo, no eléctrodo de trabalho (do lado contrário ao da tinta de carbono), de maneira que a solução contacta com o RE e o CE e com o WE através do papel;
- Efetuar a medição voltamétrica.

As técnicas eletroquímicas usadas foram a voltametria de varrimento linear (*linear sweep voltammetry*, LSV) e voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*, CV). Os parâmetros em cada caso foram os seguintes:

LSV: varrimento desde +0,2V até +1,2V, com uma velocidade de varrimento 50 ou 100 mV/s.

CV: varrimento desde +0,2V até +1,2V, com uma velocidade de varrimento 50 ou 100 mV/s.

Entre cada leitura é necessária a lavagem do conector padrão com água ultrapura.

2.2.4. Procedimento para o desacoplamento do meio da amostra do meio para a medição voltamétrica

No que diz respeito ao desacoplamento do meio da amostra e posterior adição do meio da medida eletroquímica para permitir a leitura em papel recorreu-se ao seguinte procedimento:

- Recortar o eléctrodo;
- Adicionar 5 μ L de solução de antibiótico (em água), ou de amostra no eléctrodo de trabalho, do lado contrário ao da tinta de carbono;
- Deixar secar completamente na placa de aquecimento portátil;
- Repetir os dois pontos anteriores até totalizar o volume requerido;
- Adicionar 10 μ L de PB no eléctrodo de trabalho (do lado contrário ao da tinta de carbono), de maneira que a solução contacta com o RE e o CE e com o WE através do papel;
- Efetuar a medição voltamétrica.

As técnicas eletroquímicas usadas foram a voltametria de varrimento linear (*linear sweep voltammetry*, LSV) e voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*, CV). Os parâmetros em cada caso foram os seguintes:

LSV: varrimento desde +0,2V até +1,2V, com uma velocidade de varrimento 50 ou 100 mV/s.

CV: varrimento desde +0,2V até +1,2V, com uma velocidade de varrimento 50 ou 100 mV/s.

Entre cada leitura é necessária a lavagem do conector padrão com água ultrapura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Comportamento eletroquímico e análise da azitromicina em SPCE

Para analisar o comportamento eletroquímico da azitromicina em SPCE foram registados CVs usando 40 μL de solução de azitromicina 1,0 mM em 0,1 M PB pH 7,5

Os voltamogramas obtidos em varrimentos consecutivos são apresentados na Figura 3.1.

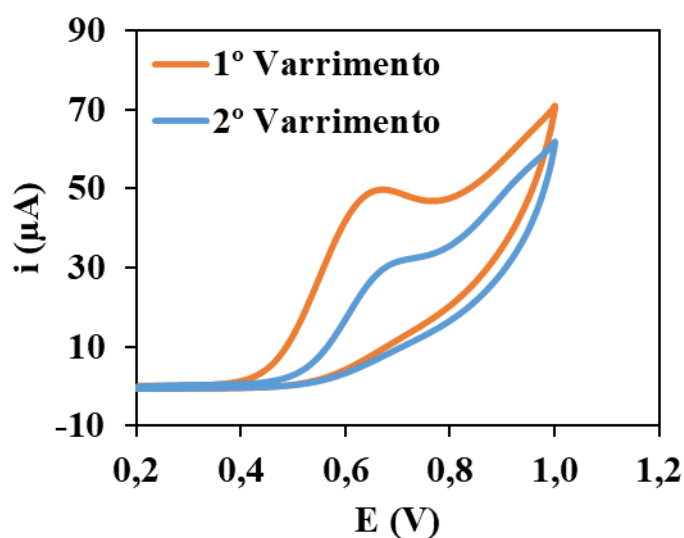


Figura 3.1: Voltamogramas cíclicos obtidos para os SPCE em dois varrimentos consecutivos. As CVs foram efetuadas em 40 μL de azitromicina 1,0 mM em 0,1M PB pH 7,5. Velocidade de varrimento de 50 mV/s.

Na Figura 3.1 é possível observar-se a existência de um pico anódico a aproximadamente 0,7 V. A ausência de picos catódicos e a supressão significativa da corrente do pico anódico no segundo varrimento indica que a oxidação da azitromicina é irreversível. Assim sendo, usando a intensidade de corrente desse pico de oxidação da azitromicina como sinal analítico, foi possível construir as curvas de calibração. Para isso foram registados LSVs para diferentes concentrações de azitromicina, obtendo uma curva de calibração com duas faixas lineares, tal como se pode verificar nas Figura 3.2. O registo das medições encontra-se no Anexo A.1.

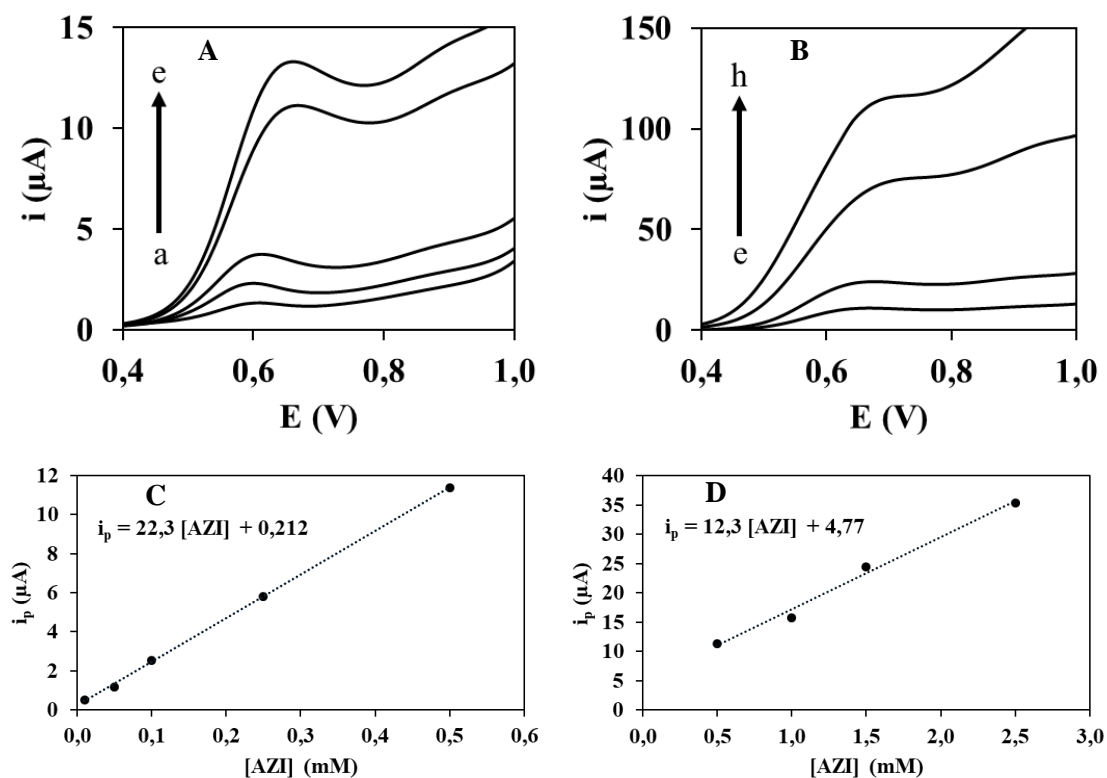


Figura 3.2: A, B- LSVs obtidos com SPCEs para soluções de azitromicina de diferentes concentrações em 0,1M PB pH 7,5: a) 0,01 mM, b) 0,05 mM, c) 0,1 mM, d) 0,25 mM, e) 0,5 mM, f) 1,0 mM, g) 1,5 mM, h) 2,5 mM. Velocidade de varrimento de 50 mV/s. C, D- Faixas lineares da curva de calibração obtida representando a intensidade da corrente de pico para cada concentração de azitromicina.

Depois de construídas as curvas de calibração, fez-se o tratamento estatístico das mesmas para se caracterizar o método (Tabela 3.1, Anexo B).

Tabela 3.1: Registo dos parâmetros referentes ao tratamento estatístico das curvas da calibração da Figura 3.2.

Parâmetro	Figura 3.2 C	Figura 3.2 D
Gama linear	0,01-0,5 mM	0,5-2,5 mM
Coefficiente de correlação (r)	0,9995	0,9902
Desvio padrão da regressão linear ($S_{y/x}$)	0,110	1,28
Declive da reta (m)	22,3 $\mu\text{A}/\text{mM}$	12,3 $\mu\text{A}/\text{mM}$
Ordenada na origem (b)	0,212 μA	4,77 μA
Desvio padrão do método (S_{x_0})	0,00491 mM	0,104 mM
Limite de Detecção (LOD)	0,015 mM	0,31 mM
Limite de Quantificação (LOQ)	0,049 mM	1,04 mM

A Figura 3.2 mostra a resposta dos SPCEs para concentrações de azitromicina entre 0,01 e 2,5 mM. Foi obtida uma faixa dinâmica de concentrações, nomeadamente, três ordens de grandeza de concentrações, e obtiveram-se duas faixas de linearidade, uma para baixas concentrações, de 0,01 a 0,5 mM e outra para concentrações mais elevadas, de 0,5 a 2,5 mM, com dois declives distintos: a primeira faixa linear mostra um declive que é quase o dobro do declive do segundo (Tabela 3.1). Isto significa que a azitromicina pode ser determinada numa gama alargada de concentrações, sendo que a sensibilidade para concentrações mais baixas é mais elevada do que para concentrações mais altas.

3.2. Comportamento eletroquímico e análise da azitromicina em elétrodos de papel

Para analisar o comportamento eletroquímico da azitromicina nos elétrodos de papel foram registados CVs usando 10 μl de solução de azitromicina em 0,1M PB pH 7,5.

Os voltamogramas obtidos em varrimentos consecutivos usando um eléctrodo de papel são apresentados na Figura 3.3.

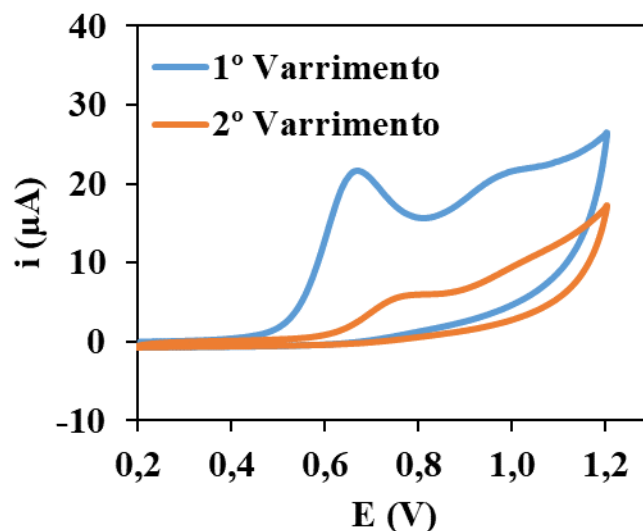


Figura 3.3: Voltamogramas cíclicos obtidos para os elétrodos de papel em dois varrimentos consecutivos. As CVs foram efetuadas em 10 μ L de azitromicina 0,5 mM em 0,1 M PB pH 7.5. Velocidade de varrimento de 50 mV/s.

Na Figura 3.3 é possível observar-se a existência de um pico anódico a aproximadamente 0,7 V. A ausência de picos catódicos e a supressão significativa da corrente do pico anódico no segundo varrimento indica que a oxidação da azitromicina é irreversível.

Para confrontar o comportamento da azitromicina nos elétrodos de papel e nos SPCE, compararam-se as CVs obtidas com cada tipo de elétrodo nas mesmas condições, nomeadamente, a mesma concentração de azitromicina (0,1 mM), a mesma gama de potenciais e a mesma velocidade de varrimento (Figura 3.4).

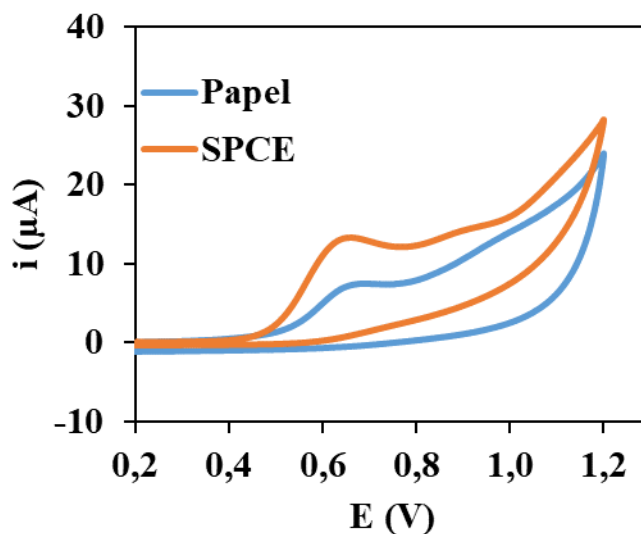


Figura 3.4: CVs obtidos para elétrodos de papel e SPCE, para uma solução de azitromicina 0,1 mM em 0,1M PB pH 7,5. Velocidade de varrimento de 50 mV/s.

Após a análise da Figura 3.4 é possível concluir-se que, o potencial do pico anódico é de aproximadamente 0,7 V para ambos os tipos de elétrodos.

No que diz respeito à definição do pico, aquele que se apresenta melhor definido é o pico correspondente ao eléctrodo serigrafado de carbono.

Para ser feito um estudo mais aprofundado da comparação entre os dois tipos de elétrodos, nomeadamente na performance na análise da azitromicina, procedeu-se à realização da curva de calibração dos elétrodos de papel. Neste caso também se usou a intensidade de corrente do pico como sinal analítico e recorreu-se à voltametria de varrimento linear. Assim, os LSVs obtidos para diferentes concentrações encontram-se representados na Figura 3.5.A. A medida da intensidade de corrente dos diversos picos para as concentrações dos padrões, permitiu obter uma curva de calibração, tal como se pode verificar na Figura 3.5.B. O registo das medições encontra-se no anexo A.2.

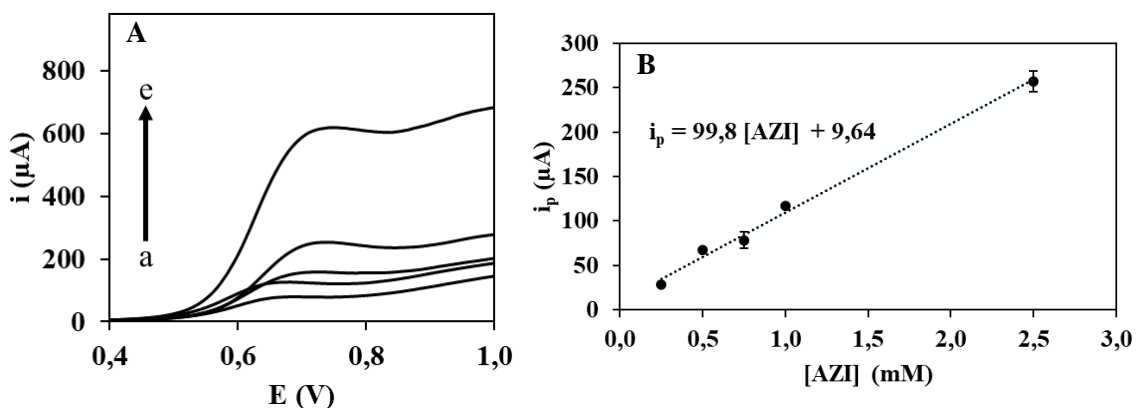


Figura 3.5: A- LSVs obtidas em elétrodos de papel para soluções de azitromicina de diferentes concentrações em 0,1 M PB pH 7,5: a) 0,25 mM, b) 0,5 mM, c) 0,75 mM, d) 1,0 mM, e) 2,5 mM. Velocidade de varrimento de 50 mV/s. B- Faixa linear da curva de calibração obtida representando a intensidade da corrente do pico para cada concentração de azitromicina. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medições.

Depois de construída a curva de calibração, fez-se o tratamento estatístico da mesma para se caracterizar o método (Tabela 3.2, Anexo B).

Tabela 3.2: Registo dos parâmetros referentes ao tratamento estatístico da curva da calibração da Figura 3.5.

Parâmetro	
Gama linear	0,25-2,5 mM
Coefficiente de correlação (r)	0,9937
Desvio padrão da regressão linear ($S_{y/x}$)	8,14
Declive da reta (m)	99,8 μA/mM
Ordenada na origem (b)	9,64 μA
Desvio padrão do método (S_{x_0})	0,0815 mM
Limite de Detecção (LOD)	0,24 mM
Limite de Quantificação (LOQ)	0,82 mM

Após a análise da Figura 3.5 e, em comparação com a curva obtida para SPCEs, é possível concluir que a zona de linearidade para elétrodos de papel é mais estreita e o LOD significativamente maior que o mais baixo obtido para SPCEs. Para os primeiros a

zona vai desde 0,25 até 2,5 mM, enquanto que, com os SPCE, se consegue uma curva de calibração com mais de duas ordens de grandeza (entre 0,01 a 2,5 mM). No entanto, os elétrodos de papel mostram maior sensibilidade que os SPCE, já que o declive obtido foi de 99,8 $\mu\text{A}/\text{mM}$ e de 12,3 $\mu\text{A}/\text{mM}$ para SPCEs nessa mesma gama de concentrações (para a zona de menores concentrações para os SPCEs o declive foi 22,3 $\mu\text{A}/\text{mM}$, o que também é muito menor que o alcançado com os elétrodos de papel).

3.3. Pré-concentração como estratégia para a melhoria do sinal analítico

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade da metodologia aplicada, procedeu-se a uma etapa de pré-concentração aproveitando a matriz porosa do papel, seguindo o exemplo de um estudo efetuado para um fármaco anti-inflamatório [55].

Neste sentido iniciou-se o estudo pela verificação da pré-concentração e da influência do volume pré-concentrado. Para isso, foram realizadas CVs utilizando a mesma concentração da azitromicina (0,5 mM) de seguinte modo: medida direta de azitromicina em PB 0,1 M pH 7,5; pré-concentrando 10 ou 20 μL de azitromicina em água para depois realizar a medição em 10 μL de PB 0,1 M pH 7,5 (Figura 3.6).

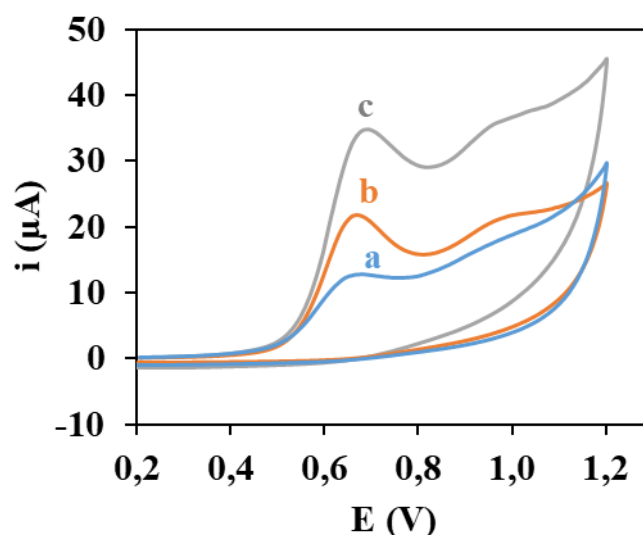


Figura 3.6: Voltamogramas cíclicos obtidos para os elétrodos de papel utilizando diferentes volumes de pré-concentração de azitromicina 0,5 mM: a) sem pré.concentração, b) 10,0 μL , c) 20,0 μL . Velocidade de varrimento de 50 mV/s.

Pela análise da Figura 3.6 verifica-se que a pré-concentração melhora tanto a intensidade de corrente do pico, como a sua definição e, quanto maior o volume utilizado no procedimento de pré-concentração, maiores são estes parâmetros.

Depois de verificada a influência do volume da solução utilizado na pré-concentração, iniciou-se a otimização das condições de trabalho, i.e. o volume da solução e a temperatura de secagem, para a análise da azitromicina. Assim sendo, foram testados diferentes volumes de solução de azitromicina 0,05 mM (em água) para depois registar, de acordo com as LSVs obtidas, a intensidade de corrente do pico anódico (segundo o procedimento indicado na secção 2.2.3). Na Figura 3.7 apresenta-se a intensidade de corrente do pico em relação ao volume usado para a pré-concentração (os valores de intensidade de corrente são indicados no Anexo A.3). No caso deste teste, as temperaturas de secagem foram controladas numa estufa.

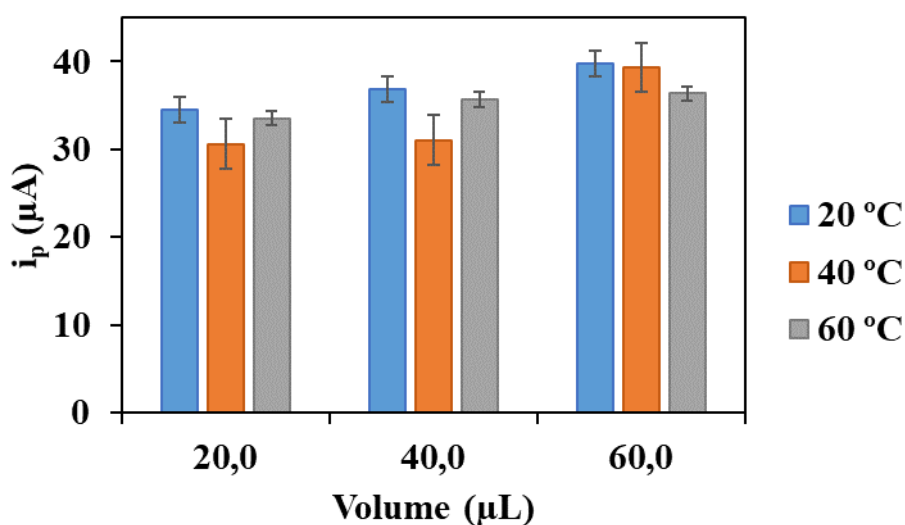


Figura 3.7: Representação gráfica da intensidade de corrente do pico para cada volume utilizado na pré-concentração e temperatura de secagem. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições.

O que se pode concluir pela análise da Figura 3.7 é que a temperatura de secagem não afeta significativamente o sinal analítico, o que levou ao estudo do tempo de secagem para cada temperatura e volume de pré-concentração (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Registo dos tempos de secagem aproximados, em horas, para cada volume de pré-concentração e temperatura de secagem.

Volume (μL) \n Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	20	40	60
20	≈ 4	≈ 4	≈ 4
40	≈ 1	≈ 2	≈ 2
60	$\approx 0,5$	≈ 1	≈ 1

Pela análise da Figura 3.7 e da Tabela 3.3, concluiu-se que as condições ótimas seriam o volume de pré-concentração de 20,0 μL e temperatura de secagem de 40 $^{\circ}\text{C}$, já que a temperatura não tem influência significativa no sinal obtido. Quanto à intensidade de corrente do pico, entre 20,0, 40,0 e 60,0 μL , esta mantém-se constante pelo que se escolheu o volume mais baixo, que apresentava o tempo de secagem mais curto entre os três. Para possibilitar uma secagem portátil, optou-se por utilizar uma placa de aquecimento portátil, onde se obtinha uma temperatura de $39 \pm 1,5$ $^{\circ}\text{C}$, tal como demonstrado na Figura 2.7.

Para ser feito um estudo mais aprofundado da comparação entre elétrodos de papel com e sem pré-concentração e os SPCE, nomeadamente na performance na análise da azitromicina, procedeu-se à construção de uma curva de calibração dos elétrodos de papel com as condições otimizadas de pré-concentração. Neste caso também se usou a intensidade de corrente do pico como sinal analítico e recorreu-se à voltametria de varrimento linear para a deteção do sinal. Os LSVs obtidos para diferentes concentrações encontram-se representados na Figura 3.8 A e B. Para isso foram registados LSVs para diferentes concentrações de azitromicina, obtendo uma curva de calibração com duas faixas lineares, tal como se pode verificar nas Figura 3.8 C e D. O registo das medições encontra-se no Anexo A.3.

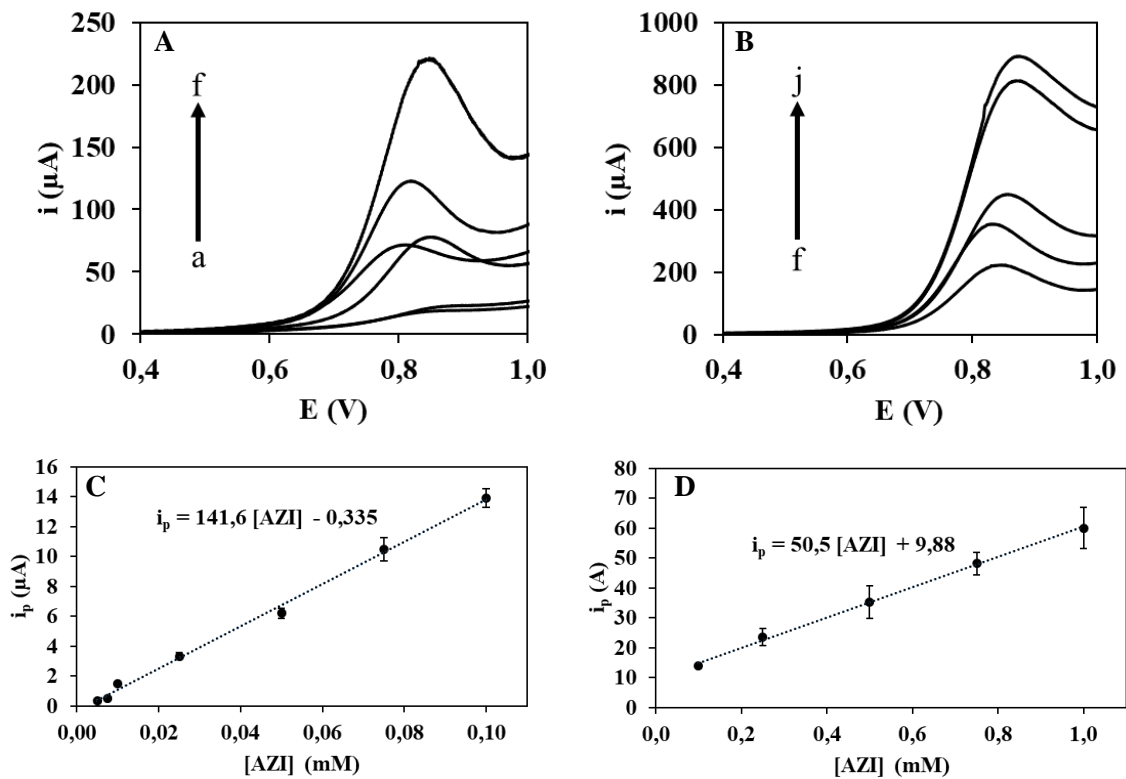


Figura 3.8: A, B- LSVs obtidos com eléctrodos de papel para soluções em PB 0,1 M pH 7,5 depois de pré-concentradas soluções de azitromicina de diferentes concentrações: a) 0,005 mM, b) 0,0075 mM, c) 0,01 mM, d) 0,025 mM, e) 0,05 mM, f) 0,1 mM, g) 0,25 mM, h) 0,5 mM, i) 0,75 mM, j) 1,0 mM. Velocidade de varrimento de 50 mV/s. C, D- Faixas lineares da curva de calibração obtida representando a intensidade da corrente de pico para cada concentração de azitromicina. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de cinco medições.

Depois de construídas as curvas de calibração, fez-se o tratamento estatístico para se caracterizar o método (Tabela 3.4, Anexo B).

Tabela 3.4: Registo dos parâmetros referentes ao tratamento estatístico das curvas da calibração da Figura 3.8.

Parâmetro	Figura 3.8 C	Figura 3.8 D
Gama linear	0,005-0,1 mM	0,1- 1,0 mM
Coefficiente de correlação (r)	0,9966	0,9981
Desvio padrão da regressão linear ($S_{y/x}$)	0,340	0,93
Declive da reta (m)	141,6 $\mu\text{A}/\text{mM}$	50,5 $\mu\text{A}/\text{mM}$
Ordenada na origem (b)	0,335 μA	9,88 μA
Desvio padrão do método (S_{x_0})	0,00240 mM	0,0183 mM
Limite de Detecção (LOD)	0,0072 mM	0,055 mM
Limite de Quantificação (LOQ)	0,024 mM	0,18 mM

Após a análise da Figura 3.8 e, em comparação com a curva obtida para SPCEs, é possível concluir que a zona de linearidade para elétrodos de papel com pré-concentração é mais alargada e o LOD é significativamente menor (15 μM). Para estes a zona vai desde 0,01 até 2,5 mM, enquanto que no papel se consegue uma zona de linearidade com mais uma ordem de grandeza (entre 0,005 até 1,0 mM). Quanto à sensibilidade, os SPCEs apresentam muito menor sensibilidade, já que os declives obtidos foram de 22,3 $\mu\text{A}/\text{mM}$ para o SPCE e 141,6 $\mu\text{A}/\text{mM}$ para os elétrodos de papel, ambos na zona de menores concentrações. Para a zona de maiores concentrações o declive foi de 12,3 $\mu\text{A}/\text{mM}$ para o SPCE, o que é muito menor que o alcançado com os elétrodos de papel, de 50,5 $\mu\text{A}/\text{mM}$.

Apesar das várias vantagens, um inconveniente verificado é que, devido à saturação do sinal obtida pela plataforma em papel, não são possíveis atingir concentrações mais altas que nos SPCEs,

Quanto ao procedimento de pré-concentração, este fez com que o LOD fosse significativamente menor (0,24 mM, para os elétrodos de papel sem pré-concentração) e alargou-se a zona de linearidade de 0,25 até 2,5 mM para 0,005 até 1,0 mM.

3.4. Análise e amostras

Para avaliar o desempenho da plataforma analítica desenvolvida do ponto de vista prático, a azitromicina foi determinada numa matriz real, nomeadamente, água da torneira, na qual foi adicionada uma quantidade conhecida de azitromicina. Neste sentido, utilizando o mesmo protocolo de pré-concentração das curvas de calibração, com base nas suas equações da reta (Figura 3.8 C e D) e na média da intensidade da corrente do pico obtida para as amostras, determinou-se a concentração de azitromicina nas mesmas. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Registo das concentrações teórica e obtida e do desvio relativo para cada uma das amostras reais.

Amostra	Concentração teórica (mM)	Concentração obtida (mM)	Desvio Relativo (%)
1	0,025	0,026	5,3
2	0,50	0,36	-28

Com base nos desvios relativos, pode-se concluir que o a plataforma analítica desenvolvida fornece resultados exatos para concentrações mais reduzidas, o que permite a sua utilização para a deteção da azitromicina em amostras reais. No entanto, com base nos valores para concentrações mais elevadas, verifica-se que a plataforma não fornece resultados satisfatórios. Para contrariar este facto teria que se recorrer a uma diluição simples da amostra.

3.5. Plataforma eletroanalítica como armazenamento de amostras

Como já foi demonstrado, a porosidade do papel usado permite a absorção de amostra. Isto serve não só para pré-concentrar, como também para usar a própria plataforma como armazenamento de amostras. Assim, ao usar papel como substrato, as amostras podem ser pré-concentradas e armazenadas até à sua medida no próprio eletrodo onde vai ser feita essa medida. Isto é muito interessante para o caso de a medição não poder ser feita no dia ou no lugar onde a amostragem é feita. Assim, estudou-se a capacidade desta plataforma para armazenar a solução de azitromicina após a pré-

concentração de 20 μL e a duas temperaturas distintas, a 4 $^{\circ}\text{C}$ e à temperatura ambiente (T_A). Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.9.

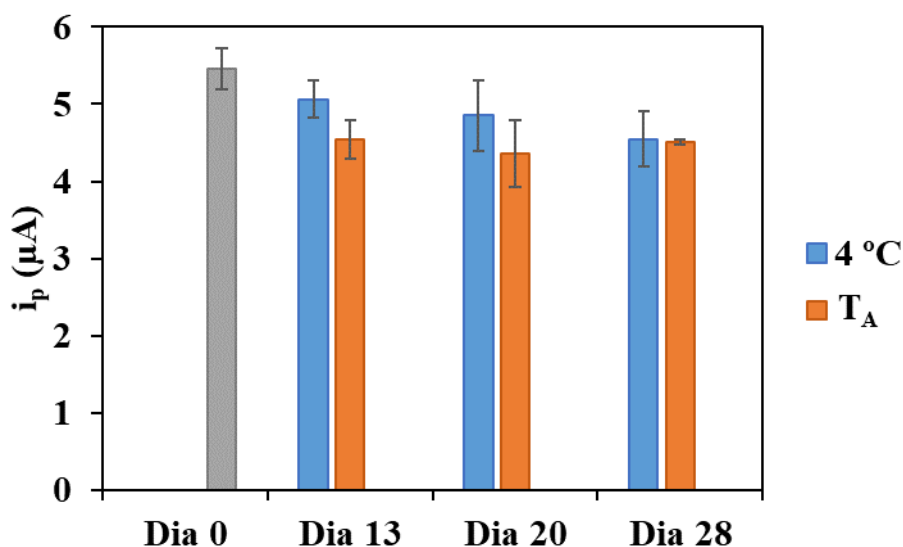


Figura 3.9: Representação gráfica da intensidade de corrente do pico ao longo do tempo e às temperaturas de armazenamento estudadas. As medições foram efetuadas em 0,1M PB pH 7,5, depois de pré-concentrados 20 μL de uma solução aquosa de azitromicina 0,05 mM. Velocidade de varrimento de 100 mV/s. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições.

A partir da análise da Figura 3.9, é possível concluir que do dia 0 para o dia 13 há um decréscimo na intensidade de corrente do pico de 7% para o armazenamento de uma amostra a 4 $^{\circ}\text{C}$ e de 17% para T_A . Ainda que este decréscimo é maior para o armazenamento a T_A , neste caso o sinal analítico após este decréscimo mantém-se estável até pelo menos 28 dias. Assim, pode-se recorrer à solução mais económica, que seria o armazenamento a T_A .

3.6. Desacoplamento do meio da amostra do meio da medição voltamétrica

Numa situação real, nem sempre uma amostra se encontra no estado aquoso, e analitos dissolvidos em solventes orgânicos não proporcionam um sinal eletroquímico de interesse. Deste modo, no presente estudo pretendeu-se, através da pré-concentração, o desacoplamento do meio da amostra do meio em que é feita a medição eletroquímica, para a determinação da azitromicina. Assim utilizaram-se diferentes meios para dissolver a azitromicina, nomeadamente, dois solventes orgânicos, metanol e acetonitrilo.

Deste modo, para analisar o comportamento eletroquímico da azitromicina em elétrodos de papel, foram efetuados CVs usando 10 μL de PB 0,1 M pH 7,5 depois de pré-concentrados 20 μL de uma solução de azitromicina 1,0 mM em metanol, no sentido de se comparar a sensibilidade e identificar-se a zona de trabalho. Assim, verificou-se o voltamograma que se obtinha, tal como se pode visualizar na Figura 3.10.

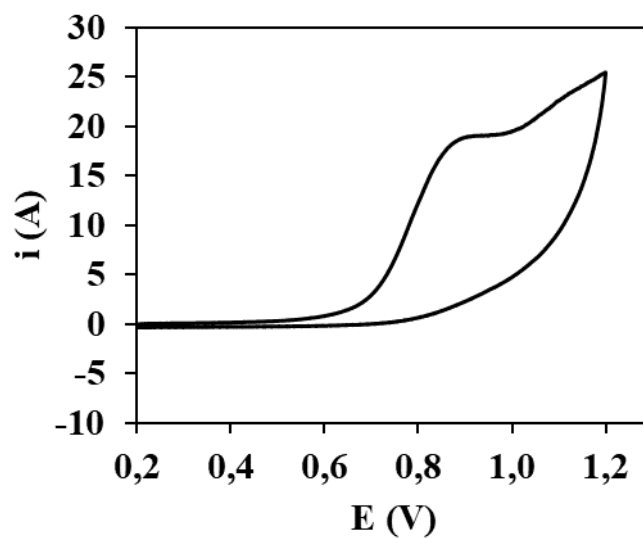


Figura 3.10: Voltamograma cíclico obtido para os elétrodos de papel. As CVs foram efetuadas em 10 μL de 0,1M PB pH 7,5 depois de pré-concentrados 20 μL de azitromicina 1,0 mM em metanol. Velocidade de varrimento de 100 mV/s.

Na Figura 3.10 é possível observar-se a existência de um pico anódico a aproximadamente 0,8 V, pelo que se considera a intensidade de corrente do pico de oxidação como o sinal analítico.

Assim, à semelhança de como se efetuou em amostras aquosas, procurou-se verificar o volume de pré-concentração ideal, primeiro numa solução de analito dissolvida em metanol. Deste modo, na Figura 3.11 apresentam-se os resultados obtidos para diferentes volumes de pré-concentração.

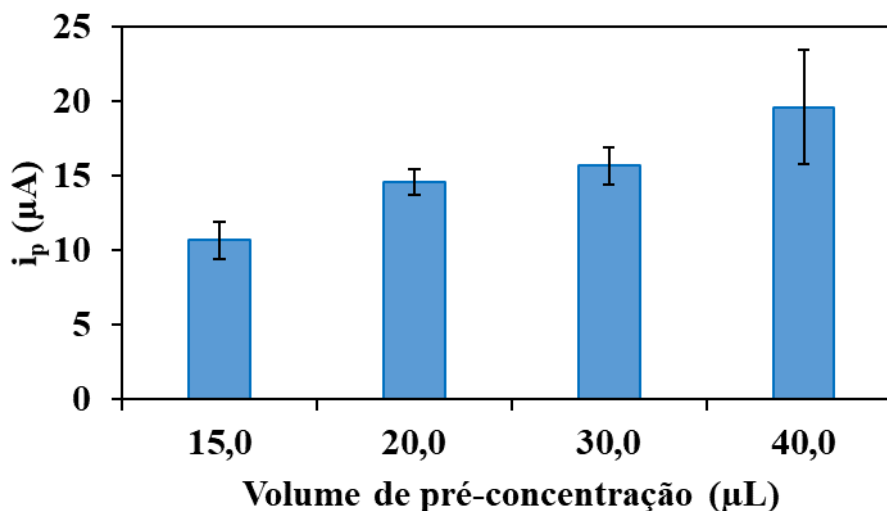


Figura 3.11: Representação gráfica da intensidade de corrente do pico anódico para cada volume de pré-concentração. As medições foram efetuadas em 0,1M PB pH 7.5, depois de pré-concentrados diferentes volumes de uma solução azitromicina 0,5 mM em metanol. Velocidade de varrimento de 100 mV/s. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições.

Pela análise da Figura 3.11, concluiu-se, mais uma vez, que o volume de pré-concentração ótimo seria o de 20,0 μL. Já que, para o volume de 30,0 μL não há um incremento significativo na intensidade de corrente do pico e, para o volume de 40,0 μL, o desvio padrão é demasiado elevado.

Para ser feito um estudo mais aprofundado da comparação entre os dois tipos de eletrodos, nomeadamente na performance na análise da azitromicina, procedeu-se à construção da curva de calibração dos eletrodos de papel, nas condições de pré-concentração ideais. Neste caso também se usou a intensidade de corrente do pico como sinal analítico e recorreu-se à voltametria de varrimento linear como técnica para a calibração. Assim, os LSVs obtidos para diferentes concentrações encontram-se representados na Figura 3.12 A e B. A medida da intensidade de corrente dos diversos picos para as concentrações dos padrões, permitiu obter uma curva de calibração, tal como se pode verificar na Figura 3.12 C e D. O registo das medições encontra-se no anexo A.4.

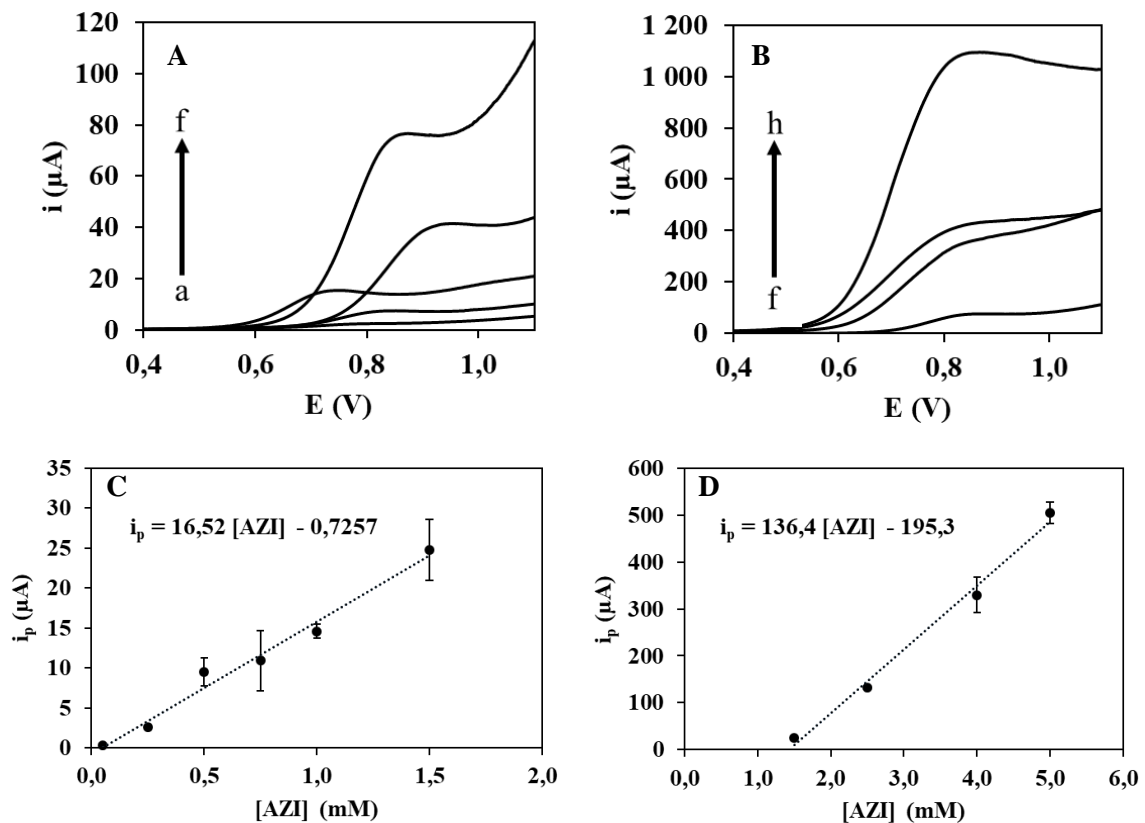


Figura 3.12: A, B- LSVs obtidos com elétrodos de papel em PB 0,1 M pH 7,5, depois de pré-concentrados 20 μL de azitromicina em metanol de diferentes concentrações: a) 0,05 mM, b) 0,25 mM, c) 0,5 mM, d) 0,75 mM, e) 1,0 mM, f) 1,5 mM, g) 2,5 mM, h) 5,0 mM. Velocidade de varrimento de 50 mV/s. C, D- Faixas lineares da curva de calibração obtida representando a intensidade da corrente de pico para cada concentração de azitromicina. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medições.

Depois de construídas as curvas de calibração, fez-se o tratamento estatístico para se caracterizar o método (Tabela 3.6, Anexo B).

Tabela 3.6: Registo dos parâmetros referentes ao tratamento estatístico das curvas da calibração das Figuras 3.12.

Parâmetro	Figura 3.12 C	Figura 3.12 D
Gama linear	0,05-1,5 mM	1,5- 5,0 mM
Coefficiente de correlação (r)	0,9816	0,9912
Desvio padrão da regressão linear ($S_{y/x}$)	1,34	24,4
Declive da reta (m)	16,53 $\mu\text{A}/\text{mM}$	136,4 $\mu\text{A}/\text{mM}$
Ordenada na origem (b)	0,7257 μA	195,3 μA
Desvio padrão do método (S_{x_0})	0,0809 mM	0,179 mM
Limite de Detecção (LOD)	0,24 mM	0,54 mM
Limite de Quantificação (LOQ)	0,81 mM	1,79 mM

A Figura 3.12 mostra a resposta dos elétrodos de papel para concentrações de azitromicina entre 0,05 e 2,5 mM, quando pré-concentrados 20 μL em metanol. Foi obtida uma faixa dinâmica de concentrações, nomeadamente, três ordens de grandeza de concentrações, e obtiveram-se duas faixas de linearidade, uma em baixas concentrações, de 0,05 a 1,5 mM e outra em concentrações mais elevadas, de 1,5 a 5,0 mM, com dois declives distintos: a segunda faixa linear mostra um declive que é quase dez vezes maior que o declive do primeiro (Tabela 3.6). Isto significa que a azitromicina, nas condições enunciadas, pode ser determinada numa gama alargada de concentrações.

Para analisar o comportamento eletroquímico da azitromicina em elétrodos de papel, depois de pré-concentrada em acetonitrilo, foram efetuados CVs usando 10 μL de PB 0,1 M pH 7,5 depois de pré-concentrados 20 μL de uma solução de azitromicina 1,0 mM em acetonitrilo, no sentido de se comparar a sensibilidade e identificar-se a zona de trabalho. Assim, verificou-se o voltamograma que se obtinha, tal como se pode visualizar na Figura 3.13.

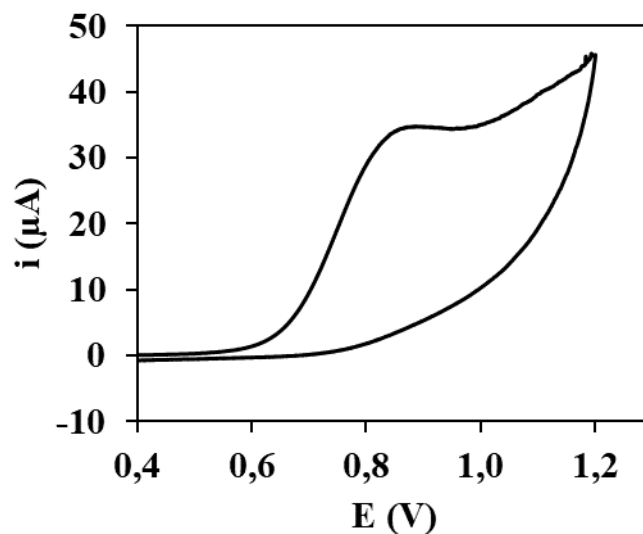


Figura 3.13: Voltamograma cíclico obtido para os elétrodos de papel. As CVs foram efetuadas em 10 μL de 0,1M PB pH 7,5 depois de pré-concentrados 20 μL de azitromicina 1,0 mM em acetonitrilo. Velocidade de varrimento de 100 mV/s.

Na Figura 3.13 é possível observar-se a existência de um pico anódico a aproximadamente 0,8 V, pelo que se considera a intensidade de corrente do pico de oxidação como o sinal analítico.

Deste modo, à semelhança de como se efetuou em amostras aquosas e em metanol, procurou-se verificar o volume de pré-concentração ideal, numa solução de analito dissolvida em acetonitrilo. Deste modo, na Figura 3.14 apresentam-se os resultados obtidos para diferentes volumes de pré-concentração.

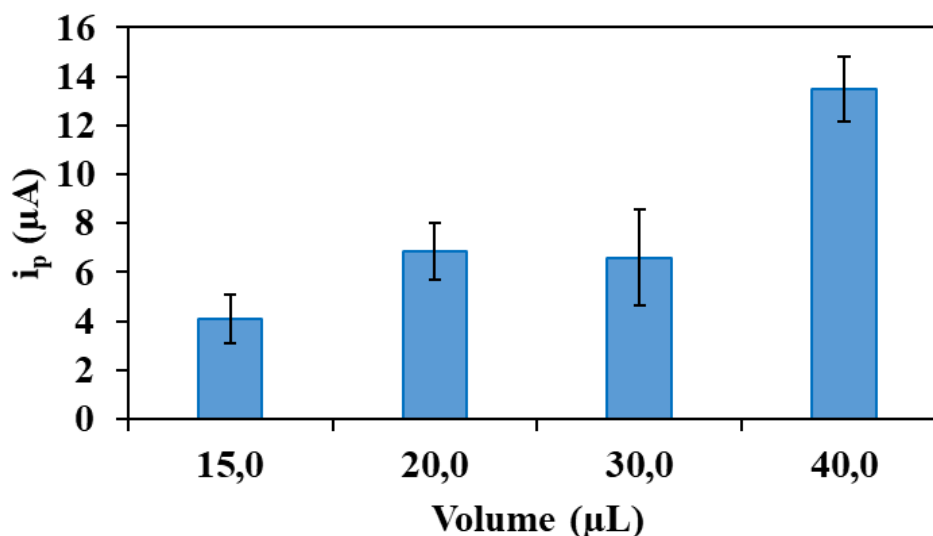


Figura 3.14: Representação gráfica da intensidade do pico anódico para cada volume de pré-concentração. As medições foram efetuadas em 0,1M PB pH 7.5, depois de pré-concentrados diferentes volumes de uma solução azitromicina 0,5 mM em acetonitrilo. Velocidade de varrimento de 100 mV/s. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições.

Pela análise da Figura 3.14, concluiu-se, mais uma vez, que o volume pré-concentração ótimo seria o de 20,0 μL . Já que, para o volume de 30,0 μL não há um incremento significativo na intensidade de corrente do pico e, para o volume de 40,0 μL , o tempo do processo de pré-concentração é demasiado elevado.

Para ser feito um estudo mais aprofundado da comparação entre os dois tipos de elétrodos, nomeadamente na performance na análise da azitromicina, procedeu-se à construção da curva de calibração dos elétrodos de papel, nas condições de pré-concentração ideais. Neste caso também se usou a intensidade de corrente do pico como sinal analítico e recorreu-se à voltametria de varrimento linear como técnica para a calibração. Assim, os LSVs obtidos para diferentes concentrações encontram-se representados na Figura 3.15 A. A medida da intensidade de corrente dos diversos picos para as concentrações dos padrões, permitiu obter uma curva de calibração, tal como se pode verificar na Figura 3.15 B. O registo das medições encontra-se no anexo A.4.

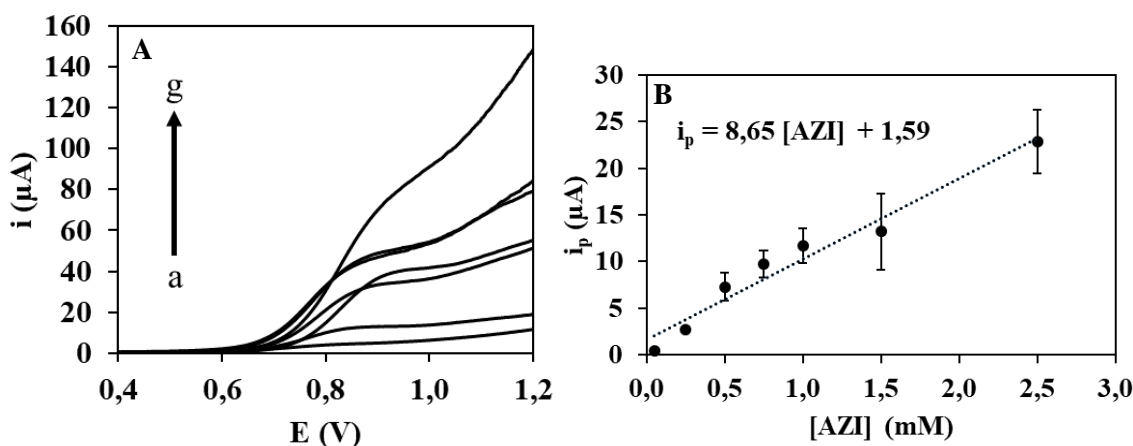


Figura 3.15: A - LSVs obtidos com elétrodos de papel em PB 0,1 M pH 7,5, depois de pré-concentrados 20 μL de azitromicina em acetonitrilo de diferentes concentrações: a) 0,05 mM, b) 0,25 mM, c) 0,5 mM, d) 0,75 mM, e) 1,0 mM, f) 1,5 mM, g) 2,5 mM. Velocidade de varrimento de 50 mV/s. B- Faixa linear da curva de calibração obtida representando a intensidade da corrente de pico para cada concentração de azitromicina. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medições.

Depois de construída a curva de calibração, fez-se o tratamento estatístico da mesma para se caracterizar o método (Tabela 3.7, Anexo B).

Tabela 3.7: Registo dos parâmetros referentes ao tratamento estatístico da curva da calibração da Figura 3.15.

Parâmetro	
Gama linear	0,05-2,5 mM
Coefficiente de correlação (r)	0,9625
Desvio padrão da regressão linear ($S_{y/x}$)	1,57
Declive da reta (m)	8,65 μA/mM
Ordenada na origem (b)	1,59 μA
Desvio padrão do método (S_{x_0})	0,182 mM
Limite de Deteção (LOD)	0,55 mM
Limite de Quantificação (LOQ)	1,8 mM

A Figura 3.15 mostra a resposta dos elétrodos de papel para concentrações de azitromicina entre 0,05 e 2,5 mM, quando pré-concentrados 20 μ L em acetonitrilo. Foi obtida uma faixa dinâmica de concentrações, nomeadamente, três ordens de grandeza de concentrações. Isto significa que a azitromicina, nas condições enunciadas, pode ser determinada numa gama alargada de concentrações.

Em resumo, através do desacoplamento do meio da amostra do meio utilizado para a leitura eletroquímica, foi possível detetar e obter uma relação linear entre a intensidade do pico e a concentração de azitromicina dissolvida em solventes orgânicos. Este facto é uma vantagem inerente à plataforma analítica desenvolvido, já que permite a análise de analitos nas condições enunciadas sem que seja necessário nenhum tratamento adicional.

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O uso massivo e persistência de produtos farmacêuticos como antibióticos, resultou que, nos últimos anos, estes se tornassem importantes contaminantes ambientais. Além disso, as estações de tratamento de águas residuais convencionais não são eficientes na sua eliminação.

Nesta dissertação procurou-se o desenvolvimento de uma plataforma eletroanalítica que respondesse à necessidade de detetar um fármaco em amostras ambientais, nomeadamente a azitromicina, de uma forma simples, fácil e verde. Na Tabela 4.1 encontram-se os intervalos de concentração e os limites de deteção obtidos com as plataformas testadas.

Tabela 4.1: Intervalo de concentração e LOD obtidos para os SPCE, elétrodos de papel com e sem pré-concentração.

Parâmetro	SPCE	Papel (sem pré-concentração)	Papel (com pré-concentração)
Intervalo concentração (mM)	0,01-2,5	0,25-2,5	0,005-1,0
LOD (μM)	15	240	7

Assim, pode-se concluir que as melhores características analíticas foram obtidas utilizando a plataforma em papel com a aplicação da pré-concentração. Foi, ainda, possível aplicar a plataforma na deteção do fármaco em estudo em amostras reais. Do ponto de vista de armazenamento de amostras na plataforma de papel, observou-se um abaixamento do sinal analítico após 13 dias. No entanto, a partir deste período o sinal manteve-se estável até pelo menos 28 dias. Por fim, também se testou com sucesso o desacoplamento do meio da amostra do meio da medição voltamétrica. Isto permitiu a análise da azitromicina em solventes orgânicos, o que pode interessante porque permitirá a utilização da plataforma desenvolvida após um pré-tratamento da amostra que requer este tipo de solventes.

A plataforma desenvolvida possui inúmeras vantagens, nomeadamente a simplicidade, sensibilidade e baixo custo. O uso de papel confere o enorme potencial de integrar a plataforma em sistemas de análise portátil de modo a melhorar e facilitar a

análise *in situ*. A principal novidade desta plataforma é que esta possibilitou uma estratégia simples para pré-concentrar o analito no WE em que a deteção é realizada.

Para perspetivas futuras a curto prazo, poderá ser feita uma análise de um número superior de amostras reais, nomeadamente, matrizes distintas das estudadas. Além disso, sugere-se o teste de solventes orgânicos que não os utilizados no presente trabalho.

O principal inconveniente da plataforma desenvolvida é o facto de não ser seletiva. Deste modo, sugere-se, ainda, a inclusão de um elemento de reconhecimento na plataforma, que permitirá a análise seletiva de azitromicina em amostras complexas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. Liu, M. Bilal, X. Duan, and H. M. N. Iqbal, “Mitigation of environmental pollution by genetically engineered bacteria — Current challenges and future perspectives,” *Sci. Total Environ.*, vol. 667, pp. 444–454, 2019.
- [2] K. Constant, C. Nourry, and T. Seegmuller, “Population growth in polluting industrialization,” *Resour. Energy Econ.*, vol. 36, no. 1, pp. 229–247, 2014.
- [3] M. Haseena *et al.*, “Water pollution and human health,” *Environ. Risk Assess. Remediat.*, vol. 1, no. 3, pp. 16–19, 2017.
- [4] E. Popek, *Sampling and Analysis of Environmental Chemical Pollutants*, 2nd ed. Elsevier Inc., 2018.
- [5] W. Q. Association, “Contaminants of Emerging Concern,” 2019. [Online]. Available: <https://www.wqa.org/whats-in-your-water/emerging-contaminants>. [Accessed: 15-Apr-2019].
- [6] M. Gros, M. Petrović, A. Ginebreda, and D. Barceló, “Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes,” *Environ. Int.*, vol. 36, no. 1, pp. 15–26, 2010.
- [7] I. T. Carvalho and L. Santos, “Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario,” *Environ. Int.*, vol. 94, pp. 736–757, 2016.
- [8] K. Fent, A. A. Weston, and D. Caminada, “Ecotoxicology of human pharmaceuticals,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 76, no. 2, pp. 122–159, 2006.
- [9] C. Bolognesi and F. D. Merlo, *Pesticides: Human Health Effects*, 2nd ed., no. March. Elsevier Inc., 2011.
- [10] A. Ascherio *et al.*, “Pesticide Exposure and Risk for Parkinson ’ s Disease,” pp. 197–203, 2006.
- [11] M. Taheran, M. Naghdi, S. K. Brar, M. Verma, and R. Y. Surampalli, “Emerging contaminants: Here today, there tomorrow!,” *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.*, vol. 10, no. February, pp. 122–126, 2018.
- [12] T. F. T. Omar, A. Z. Aris, F. M. Yusoff, and S. Mustafa, “Occurrence and level of

- emerging organic contaminant in fish and mollusk from Klang River estuary, Malaysia and assessment on human health risk,” *Environ. Pollut.*, vol. 248, pp. 763–773, 2019.
- [13] Z. Zhang, K. Zeng, and J. Liu, “Immunochemical detection of emerging organic contaminants in environmental waters,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 87, pp. 49–57, 2017.
- [14] X. Y. W. Wen Ping Zhao, Guo Zhao, Dong Fei Chen, Zhi Huai Mao, “Rapid Detection Technology for Pesticides Residues Based on Microelectrodes Impedance Immunosensor,” *Sensors and Transducers*, vol. 178, no. 9, pp. 56–62, 2014.
- [15] N. A. Meredith, C. Quinn, D. M. Cate, T. H. Reilly, J. Volckens, and C. S. Henry, “Paper-based analytical devices for environmental analysis,” *Analyst*, vol. 141, no. 6, pp. 1874–1887, 2016.
- [16] P. Paíga, L. H. M. L. M. Santos, S. Ramos, S. Jorge, J. G. Silva, and C. Delerue-Matos, “Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation,” *Sci. Total Environ.*, vol. 573, pp. 164–177, 2016.
- [17] T. Korzybski, Z. Kowszyk-Gindifer, and W. Kurylowicz, *Antibiotics*, 1st ed. PWN - Polish Scientific Publishers, 1967.
- [18] K. Kümmerer, “Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I,” *Chemosphere*, vol. 75, no. 4, pp. 417–434, 2009.
- [19] M. C. Danner, A. Robertson, V. Behrends, and J. Reiss, “Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects,” *Sci. Total Environ.*, vol. 664, pp. 793–804, 2019.
- [20] J. O’Neill, “Tackling Drug-Resistant Infections Globally,” *AMR Review Paper*, 2016. [Online]. Available: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final_paper_with_cover.pdf. [Accessed: 15-Apr-2019].
- [21] J. O’Neill, “AMR Review Paper-Tackling a crisis for the health and wealth of nations,” *AMR Review Paper*, 2014. [Online]. Available: [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR Review Paper - Tackling a crisis for the health](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health)

and wealth of nations_1.pdf. [Accessed: 15-Apr-2019].

- [22] R. C. Founou, L. L. Founou, and S. Y. Essack, “Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis,” *PLoS One*, vol. 12, no. 12, pp. 1–18, 2017.
- [23] M. González-Pleiter *et al.*, “Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment,” *Water Res.*, vol. 47, no. 6, pp. 2050–2064, 2013.
- [24] C. L. Gordon, “Azithromycin,” in *Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition*, 2017, pp. 1122–1149.
- [25] M. G. Papich, “Azithromycin,” *Saunders Handb. Vet. Drugs*, pp. 67–69, 2016.
- [26] D. E. Koch, A. Bhandari, L. Close, and R. P. Hunter, “Azithromycin extraction from municipal wastewater and quantitation using liquid chromatography / mass spectrometry,” vol. 1074, pp. 17–22, 2005.
- [27] A. A. Ensafi, A. R. Allafchian, and B. Rezaei, “A sensitive and selective voltammetric sensor based on multiwall carbon nanotubes decorated with MgCr₂O₄ for the determination of azithromycin,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 103, pp. 468–474, 2013.
- [28] O. Vajdle *et al.*, “Voltammetric behavior and determination of the macrolide antibiotics azithromycin, clarithromycin and roxithromycin at a renewable silver – amalgam film electrode,” *Electrochim. Acta*, vol. 229, pp. 334–344, 2017.
- [29] G. Kreysa, K. Ota, and R. F. Savinell, *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*. New York City, NY, 2014.
- [30] P. Alegre, “D.A.Skoog,F.J.Holler,T.a.Nieman;Princípios de Análise Experimental,5ª Ed.,Bookman,Porto Alegre(1998),” pp. 211–381, 1998.
- [31] X. Zhu and L. Shi, “Electrochemistry,” in *Nano-Inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications*, Elsevier Inc., 2019, pp. 209–236.
- [32] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 8th ed., vol. 5, no. C. LTC, 1971.

- [33] C. G. Zoski, *Handbook of Electrochemistry*, 1st ed. Elsevier, 2007.
- [34] A. J. Bard and Larry R. Faulkner, *Electrochemical methods, fundamentals and applications*, 2nd ed., vol. 60, no. 1. 2001.
- [35] B. Srinivasan and S. Tung, “Development and Applications of Portable Biosensors,” *J. Lab. Autom.*, vol. 20, no. 4, pp. 366–389, 2015.
- [36] B. Derkus, “Biosensors and Bioelectronics Applying the miniaturization technologies for biosensor design,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 79, pp. 901–913, 2016.
- [37] D. Martín-Yerga, E. Costa Rama, and A. Costa García, “Electrochemical study and determination of electroactive species with screen-printed electrodes,” *J. Chem. Educ.*, vol. 93, no. 7, pp. 1270–1276, 2016.
- [38] Z. Taleat, A. Khoshroo, and M. Mazloun-Ardakani, “Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013),” *Microchim. Acta*, vol. 181, no. 9–10, pp. 865–891, 2014.
- [39] S. Kröger and A. P. F. Turner, “Solvent-resistant carbon electrodes screen printed onto plastic for use in biosensors,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 347, no. 1–2, pp. 9–18, 1997.
- [40] R. A. S. Couto, J. L. F. C. Lima, and M. B. Quinaz, “Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis,” *Talanta*, vol. 146, no. 228, pp. 801–814, 2016.
- [41] V. R. R. Bernardo-Boongaling, N. Serrano, J. J. García-Guzmán, J. M. Palacios-Santander, and J. M. Díaz-Cruz, “Screen-printed electrodes modified with green-synthesized gold nanoparticles for the electrochemical determination of aminothiols,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 847, no. March, p. 113184, 2019.
- [42] H. Beitollahi, H. Mahmoudi-Moghaddam, S. Tajik, and S. Jahani, “A modified screen printed electrode based on La³⁺-doped Co₃O₄ nanocubes for determination of sulfite in real samples,” *Microchem. J.*, vol. 147, no. March, pp. 590–597, 2019.

- [43] T. Rungsawang, E. Punrat, J. Adkins, C. Henry, and O. Chailapakul, “Development of Electrochemical Paper-based Glucose Sensor Using Cellulose-4-aminophenylboronic Acid-modified Screen-printed Carbon Electrode,” *Electroanalysis*, vol. 28, no. 3, pp. 462–468, 2016.
- [44] F. Li, X. Wang, J. Liu, Y. Hu, and J. He, “Double-layered microfluidic paper-based device with multiple colorimetric indicators for multiplexed detection of biomolecules,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 288, no. August 2018, pp. 266–273, 2019.
- [45] Y. Yang, E. Noviana, M. P. Nguyen, B. J. Geiss, D. S. Dandy, and C. S. Henry, “Paper-Based Microfluidic Devices: Emerging Themes and Applications,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 71–91, 2017.
- [46] D. M. Cate, J. A. Adkins, J. Mettakoonpitak, and C. S. Henry, “Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices,” *Anal. Chem.*, vol. 87, pp. 19–41, 2015.
- [47] T. Akyazi, L. Basabe-desmonts, and F. Benito-lopez, “Analytica Chimica Acta Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1001, pp. 1–17, 2018.
- [48] S. Ahmed, M. N. Bui, and A. Abbas, “Biosensors and Bioelectronics Paper-based chemical and biological sensors : Engineering aspects,” vol. 77, pp. 249–263, 2016.
- [49] O. Amor-Gutiérrez, E. Costa Rama, A. Costa-García, and M. T. Fernández-Abedul, “Paper-based maskless enzymatic sensor for glucose determination combining ink and wire electrodes,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 93, no. June 2016, pp. 40–45, 2017.
- [50] A. W. Martinez, S. T. Phillips, and G. M. Whitesides, “Diagnostics for the Developing World : Microfluidic Paper-Based Analytical Devices,” vol. 82, no. 1, pp. 3–10, 2010.
- [51] K. E. Berg, J. A. Adkins, S. E. Boyle, and C. S. Henry, “Manganese Detection Using Stencil-printed Carbon Ink Electrodes on Transparency Film,” *Electroanalysis*, vol. 28, no. 4, pp. 679–684, 2016.

- [52] L. Shayne *et al.*, “Advances in Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Food and Water Analysis.”
- [53] M. M. Gong and D. Sinton, “Turning the Page : Advancing Paper-Based Microfluidics for Broad Diagnostic Application,” 2017.
- [54] “Screen-printed electrodes,” *DropSens*. [Online]. Available: http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html. [Accessed: 07-Oct-2019].
- [55] E. Costa-Rama, H. P. A. Nouws, C. Delerue-Matos, M. C. Blanco-López, and M. T. Fernández-Abedul, “Preconcentration and sensitive determination of the anti-inflammatory drug diclofenac on a paper-based electroanalytical platform,” *Anal. Chim. Acta*, 2019.

ANEXO A

A.1. Comportamento e análise da azitromicina em SPCE

Tabela A.1: Registo intensidade do pico anódico das LSVs obtidas para cada concentração de azitromicina usando SPCEs.

Concentração (mM)	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00	1,50	2,50
Intensidade (μA)	0,49	1,18	2,54	5,80	11,4	15,8	24,4

A.2. Comportamento e análise da azitromicina em elétrodos de papel

Tabela A.2: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina usando elétrodos de papel.

Concentração (mM)	0,25	0,50	0,75	1,00	2,50
Média da Intensidade (μA)	27,8	67,2	74,5	122	257
Desvio padrão (μA)	0,4	9,3	6,6	13	5,7
Desvio padrão Relativo (%)	1,5	13,8	8,8	10	2,2

A.3. Pré-concentração e a melhoria do sinal analítico

Tabela A.3: Registo dos volumes de pré-concentração e temperatura de secagem e respetivas médias da intensidade do pico anódico, desvio padrão e desvio padrão relativo para 3 réplicas efetuadas, para a concentração de 0,050 mM de azitromicina.

Volume (μL)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Média da Intensidade (μA)	Desvio padrão (μA)	Desvio Padrão Relativo (%)
20,0	20	30,6	3,0	8,5
	40	33,6	2,6	8,3
	60	34,5	4,0	12
40,0	20	31,0	3,3	9,0
	40	35,7	2,6	8,3
	60	36,9	6,4	18
60,0	20	39,3	3,4	8,4
	40	36,4	5,2	13
	60	39,8	9,8	27

Tabela A.4 Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 5 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina pré-concentrada usando elétrodos de papel, para a zona de baixas concentrações.

Concentração (mM)	0,005	0,0075	0,01	0,025	0,050	0,075	1,0
Média da Intensidade (μA)	0,33	0,51	1,50	3,33	6,20	10,5	13,9
Desvio padrão (μA)	0,12	0,06	0,12	0,24	0,32	0,76	0,62
Desvio padrão Relativo (%)	36	12	8,0	7,2	5,2	7,2	4,5

Tabela A.5: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 5 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina pré-concentrada usando elétrodos de papel, para a zona de altas concentrações.

Concentração (mM)	0,10	0,25	0,50	0,75	1,0
Média da Intensidade (μA)	13,9	23,6	35,2	48,1	60,0
Desvio padrão (μA)	0,60	2,8	5,5	3,8	6,8
Desvio padrão Relativo (%)	4,5	12	16	8,0	11

A.4. Desacoplamento do meio da amostra do meio da medição voltamétrica

Tabela A.6: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para volume de solução de azitromicina 1,0 mM pré-concentrada em metanol, usando elétrodos de papel.

Volume (μL)	5,0	10,0	15,0	20,0	30,0	40,0
Média da Intensidade (μA)	5,3	6,3	10,7	14,6	15,6	19,6
Desvio padrão (μA)	0,55	0,57	1,2	0,87	1,3	3,8
Desvio padrão Relativo (%)	10	8,9	12	6,0	8,0	20

Tabela A.7: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina pré-concentrada em metanol, usando elétrodos de papel, para a zona de baixas concentrações.

Concentração (mM)	0,05	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5
Média da Intensidade (μA)	0,28	2,60	9,49	10,9	14,6	24,8
Desvio padrão (μA)	0,07	0,21	1,7	3,8	0,87	3,9
Desvio padrão Relativo (%)	25	8,0	18	35	6,0	16

Tabela A.8: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina pré-concentrada em metanol, usando elétrodos de papel, para a zona de altas concentrações.

Concentração (mM)	1,5	2,5	4	5
Média da Intensidade (μA)	24,8	132	323	505
Desvio padrão (μA)	3,9	37	23	20
Desvio padrão Relativo (%)	16	28	6,8	3,9

Tabela A.9: Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para volume de solução de azitromicina 0,50 mM pré-concentrada em acetonitrilo, usando elétrodos de papel.

Volume (μL)	5,0	10,0	15,0	20,0	30,0	40,0
Média da Intensidade (μA)	1,87	4,64	4,07	6,87	6,60	13,5
Desvio padrão (μA)	0,17	1,0	0,99	1,2	2,0	1,3
Desvio padrão Relativo (%)	9,2	22	24	17	30	9,7

Tabela A.10 Registo das médias, desvio padrão e desvio padrão relativo da intensidade do pico anódico obtido por LSV, para 3 réplicas efetuadas para cada concentração de azitromicina pré-concentrada em acetonitrilo, usando elétrodos de papel.

Concentração (mM)	0,025	0,05	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2,5
Média da Intensidade (μA)	0,20	0,41	2,67	7,30	9,70	11,7	13,2	22,8
Desvio padrão (μA)	0,12	0,11	1,5	1,5	1,9	4,1	3,4	6,3
Desvio padrão Relativo (%)	61	28	55	20	19	35	26	27

ANEXO B

B.1. Tratamento estatístico dos dados da curva de calibração

Desvio padrão da regressão linear: $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{(N - 2)}}$

Declive: $m = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$

Intercepção: $a = \bar{y} - m\bar{x}$

Coefficiente de correlação: $r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \times \sum(y_i - \bar{y})^2}}$

Desvio padrão do método: $S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{m}$

Limite de deteção: $LOD = 3 \times \frac{S_{y/x}}{m}$

Limite de quantificação: $LOQ = 10 \times \frac{S_{y/x}}{m}$