



Materiais e dispositivos sensores para a Norfloxacina

JOAQUIM DOMINGOS LOPES ALVES

Novembro de 2015

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

.....

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RAMO OPTIMIZAÇÃO ENERGÉTICA NA INDÚSTRIA QUÍMICA



Materiais e dispositivos sensores para a Norfloxacinina

Joaquim Domingos Lopes Alves

Novembro de 2015

Orientação: Doutora Maria Goreti Sales e Mestre Liliana Truta

Agradecimentos

À Doutora Maria Goreti Sales e ao Engenheiro Alfredo Crispim por me terem dado hipótese de concluir esta etapa acadêmica e por estarem sempre disponíveis para me ajudarem.

A todas as pessoas do Biomark pela simpatia e ajuda.

Aos meus pais que sempre se esforçaram para que eu estudasse.

E por último à pessoa mais importante, Liliana Truta, por estar sempre comigo, por ser um pilar na minha vida...

Resumo

O trabalho consistiu no desenvolvimento e caracterização de sensores potenciométricos com base em polímeros de impressão molecular para a determinação de um antibiótico, a norfloxacin, em aquacultura.

A simplicidade, o baixo custo e a interação rápida e reversível dos sensores potenciométricos com os analitos fizeram com que este fosse o tipo de sensor escolhido. O material sensor foi obtido por tecnologia de impressão molecular, baseada em polimerização em *bulk*, em que a NOR foi a molécula molde e foram utilizados como monómeros para autoconstrução dos sensores o pirrol, isoladamente, ou em conjunto com partículas de sílica gel funcionalizadas com 3-aminopropil. Também foi obtido material sensor, para controlo, em que a molécula molde NOR não estava presente (NIP). As características dos materiais sensores foram sujeitas a análise de microscopia eletrónica SEM e análise por espectrómetro de infravermelhos com transformada de Fourier.

Os materiais sensores foram incluídos em membranas poliméricas, que seriam incorporadas em elétrodos. A avaliação do desempenho dos elétrodos foi feita através de curvas de calibração em diferentes meios (PBS, MES e HEPES). Também foi efetuada com sucesso a análise da sensibilidade dos elétrodos em água dopada.

As diversas avaliações e análises efetuadas levaram a concluir que o MIP de pirrol com aditivo aniónico, foi o material sensor testado que permitiu obter melhores propriedades de resposta.

Palavras-Chave: Sensor, Norfloxacin, Antibiótico, Água, Aquacultura.

Abstract

The proposed work concerns the development and characterization of potentiometric sensors based on molecularly imprinted polymers for the determination of norfloxacin, in aquaculture.

The simplicity, low cost and rapid and reversible interaction of potentiometric sensors with the analytes led to choose this type of sensor. The sensor material was obtained by molecular imprinting technology based on bulk polymerization, wherein the NOR was the template molecule and were used as monomers the pyrrole, alone or together with silica gel particles functionalized with 3 -aminopropyl. The characteristics of the sensors materials were subjected to electron microscopy analysis SEM and analysis by infrared Fourier transform spectrometer.

The sensors materials were included in polymer membranes which would be incorporated into electrodes. The evaluation of the performance of the electrodes was made using calibration curves in different buffers (PBS, MES and HEPES). It has also been successfully performed sensitivity analysis of doped electrodes in water.

The various reviews and analyzes performed led to conclude that the MIP Py with anionic additive have the better response properties.

Key-words: Sensor, Norfloxacin, Antibiotic, Water, Aquaculture

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Aquacultura.....	1
1.2. Compostos presentes na aquacultura.....	3
1.2.1. Antibióticos na aquacultura.....	5
1.3. Métodos analíticos para detecção de antibióticos em aquacultura	7
1.3.1. Métodos óticos	7
1.3.2. Métodos separativos	8
1.3.3. Métodos eletroanalíticos.....	9
1.4. Potenciometria	9
1.4.1. Eléttodos.....	10
1.4.2. Base teórica.....	11
1.4.3. Curva de calibração	12
1.4.4. Tempo de resposta	13
1.4.5. Drift	13
1.4.6. Efeito de pH.....	14
1.4.7. Seletividade	14
1.5. Polímeros de impressão molecular.....	15
1.5.1. Síntese	17
2. Descrição Experimental	19
2.1 Reagentes.....	19
2.2 Material e equipamentos.....	19
2.3 Preparação do material sensor.....	20
2.4 Caracterização dos materiais sensores	23
2.5 Preparação das membranas seletivas e construção dos eléctrodos	23
2.6. Avaliação do desempenho dos eléctrodos	25
2.7. Análise de amostras	26
3. Resultados e discussão	27
3.1. Caracterização do material sensor	27
3.1.1. FTIR.....	27
3.1.2 Análise da superfície dos materiais sensores.....	29
3.2. Desempenho dos sensores potenciométricos	33

3.2.1. Desempenho dos sensores na detecção de NOR preparada em tampão PBS.....	33
3.2.1. Desempenho dos sensores na detecção de NOR preparada em meio HEPES.....	40
3.3. Seletividade em água dopada	43
3.3.1. Aplicação Analítica	45
4. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros	49
5. Referências bibliográficas.....	51

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura molecular de fluorquinolonas e quinolonas: ciprofloxacina (CP), enofloxacina (ENO), NOR, enrofloxacina (ENR).....	7
Figura 2 - Célula eletroquímica com análise da potenciometria com recurso a um ESI [25].	10
Figura 3 - Curva de calibração de um ESI	12
Figura 4 - Representação gráfica do tempo de resposta t_r ($\Delta E/\Delta t$).....	13
Figura 5 - Representação esquemática do processo de impressão molecular].....	16
Figura 6 – Representação do procedimento de preparação do MIP recorrendo ao método de polimerização em “bulk” [38].	17
Figura 7- Representação esquemática do processo de preparação do M Py.....	21
Figura 8 - Representação esquemática do processo de preparação do M Si-Py.....	22
Figura 9 - Confirmação da ausência/ presença de NOR por método colorimétrico	22
Figura 10 - Processo de construção dos elétrodos seletivos	25
Figura 11 - Espectros de FTIR/ATR representativos dos materiais: (A) NOR, (B) MPy, (C) NPy, (D) nanopartículas de sílica aminada, (E) MSiPy e (F) NSiPy.....	27
Figura 12 - Imagens de SEM representativas da morfologia da superfície dos materiais sensores: MPy e NPy.	31
Figura 13 - Imagens de SEM representativas da morfologia da superfície das nanopartículas de sílica aminada e dos materiais sensores preparados a partir da sua modificação: MSiPy e NSiPy.	32
Figura 14 - Gráfico representativo da comparação da microanálise por raios X: (A) MPy vs NPy e (B) Si vs MSiPy vs NSiPy.	33
Figura 15 - Calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão PBS, pH de 7,40.....	34
Figura 16 - Representação gráfica dos valores médios das calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão PBS, pH de 7,40.....	35
Figura 17 - Calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão MES, pH de 4,50.....	36
Figura 18 - Representação gráfica dos valores médios das calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão MES, pH de 4,50	37
Figura 19 - Calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão HEPES, pH de 5,70.....	38
Figura 20 - Representação gráfica dos valores médios das calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão HEPES, pH de 5,70.	39
Figura 21 - Calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão HEPES, pH de 5,70.....	41

Figura 22 - Representação gráfica dos valores médios das calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações [$3,95 \times 10^{-7}$ - $1,63 \times 10^{-4}$] M de NOR, em tampão HEPES, pH de 5,70.	42
Figura 23 - Gráficos representativos da média das calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3 e ESI 7 em água de mina dopada diluída em HEPES com indicação das respectivas barras de erro	44
Figura 24 – Calibração do ESI 1 em água dopada e aplicação numa amostra de água dopada	45
Figura 25 - Calibração do ESI 2 em água dopada e aplicação numa amostra de água dopada	46
Figura 26 - Calibração do ESI 3 em água dopada e aplicação numa amostra de água dopada	46
Figura 27 – Calibração do ESI 7 em água dopada e aplicação numa amostra de água dopada	47

Índice de tabelas

Tabela 1- Substâncias farmacologicamente ativas de utilização veterinária.....	4
Tabela 2 - Principais agentes antimicrobianos utilizados na aquacultura e a sua importância na medicina humana [.....	6
Tabela 3 - Constituição e composição das membranas seletivas.....	24
Tabela 4 - Constituição e composição das membranas seletivas.....	24
Tabela 5 - Características potenciométricas em solução tampão PBS $5,0 \times 10^{-2}$ M, pH 7,40 ...	35
Tabela 6 - Características potenciométricas em solução tampão MES $1,0 \times 10^{-4}$ M, pH 4,50.	37
Tabela 7- Características potenciométricas em solução tampão HEPES $1,0 \times 10^{-4}$ M, pH 5,70	39
Tabela 8 - Características potenciométricas em solução tampão HEPES $1,0 \times 10^{-4}$ M, pH 5,70	42

Lista de abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
ATR	Refletância difusa atenuada
AdA	Aditivo aniônico
ESI	Elétrodo seletivo de ião
F.e.m.	Força electromotriz
FTIR	Espectrómetro de infravermelhos com transformada de Fourier
FQ	Fluorquinolas
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietyl)piperazino-1-etanosulfónico
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de deteção
LIRL	Limite inferior de resposta linear
MIP	Polímero molecularmente impresso
NIP	Polímero não impresso
NOR	Norfloxacina
oNPOE	2-nitrofeniloctil éter
PBS	Tampão fosfato salino
Py	Pirrol
PVC	<i>Policloreto de vinilo</i>
SEM	<i>Scanning Eletron Microscopy</i>
THF	Tetrahidrofurano
TpCIPB⁻	Tetrakis (4-clorofenil) borato de potássio

1. Introdução

1.1. Aquacultura

A Aquacultura consiste na criação ou cultura de organismos aquáticos que aplica técnicas concebidas para aumentar, para além das capacidades naturais do meio, a produção dos organismos em causa [1].

A localização geográfica da costa continental portuguesa permite a existência de uma grande diversidade de habitats, sendo por isso considerada uma das zonas mais ricas em termos biológicos, nomeadamente pela qualidade das suas águas e pela diversidade das espécies nelas existentes. A zona costeira portuguesa tem uma grande variedade geomorfológica, com costas baixas arenosas, mas também costas altas e rochosas, tendo a linha de costa uma extensão de cerca 1.187 quilómetros. Verifica-se a existência de algumas desembocaduras de cursos de água, nomeadamente estuários e rias, suscetíveis de reunir condições favoráveis para a prática aquícola [1].

O cultivo de espécies marinhas e salobras em Portugal começou por ser feito em águas interiores costeiras, em estuários e lagoas costeiras, utilizando regimes extensivos de produção, reaproveitando, nomeadamente, as infraestruturas da indústria de sal.

No que respeita à evolução das espécies exploradas pode-se dividir em 3 períodos distintos. Até à década de 70, a produção aquícola era dominada pelos mugilídeos, espécies tipicamente forrageiras e de baixo valor comercial, que representavam cerca de 80 % da produção piscícola. A década de 80 caracterizou-se pelo grande aumento das pisciculturas em águas interiores (particularmente de truta arco-íris), acompanhada pelos bivalves (especialmente a amêijoia) nas águas salobras e marinhas. A década de 90 é caracterizada pelo forte crescimento e modernização da aquicultura de espécies marinhas, centrada inicialmente no robalo e na dourada e, mais recentemente, no pregado e no linguado. No domínio da flora marinha estão igualmente a ser dados passos na produção de algas quer no Continente, quer na Região Autónoma da Madeira.

Na Região Autónoma da Madeira a aquicultura marinha desenvolveu-se a partir do final da década de 90 do século passado, pela necessidade de colmatar o défice de oferta de peixe no mercado regional e como oportunidade de criar novas formas de negócio, com impacte na redução da importação de peixe. A dourada é a única espécie produzida sendo utilizadas para o efeito estruturas flutuantes em mar aberto. Na Região Autónoma dos Açores ainda não existe tradição de aquacultura tendo, entre 2009 e 2011, sido dados os primeiros

passos no sentido de ser criado um quadro regulamentador, simples e flexível, para o exercício da atividade aquícola [1].

Em Portugal, desde o início dos anos 90 a produção aquícola aumentou de 4.457 toneladas em 1990, para 10.317 toneladas em 2012, representando um valor de 54 milhões de euros neste último ano [1].

A produção da União Europeia (28), com 1,28 milhões de toneladas, que corresponde apenas 1,5% da produção mundial, encontra-se concentrada em 5 países: Espanha, França, Reino Unido, Itália e Grécia. Estes países, no seu conjunto, justificam 3/4 daquela produção, tanto em peso, como em valor. [1]

Apesar do elevado crescimento da produção aquícola a nível mundial desde os anos 90 (aumentou mais de 4 vezes), em particular na Ásia, a expansão da aquicultura na União Europeia não acompanhou aquele crescimento, tendo até estagnado nos últimos anos. A Europa representava, em 2011, apenas cerca de 3,2% do volume da produção da aquicultura a nível mundial. [1]

Com um crescimento acentuado da produção de peixes e canais de distribuição melhorados, o consumo tem crescido acentuadamente nas últimas décadas [2]. Em 2008, a aquicultura contribuiu aproximadamente com 50% da produção de peixe para alimentação em todo o mundo, sendo a China, responsável por aproximadamente 70% da produção mundial enquanto o Japão e os demais países da região da Ásia-Pacífico representaram cerca de 22%. A Europa Ocidental e a América do Norte com apenas 3,5% e 1,3%, respetivamente, representam uma pequena fração da produção mundial. [3].

Em termos percentuais, até 2008, a produção aquícola foi dividida de forma aproximadamente igual, entre água marinha ou salobra (57%) e água doce (43%) e, em termos de valor, os peixes foram o produto da aquicultura dominante (54%), seguidos dos crustáceos (20%) e moluscos (14%) [3].

O consumo *per capita* de peixe na alimentação aumentou em média de 9,9 Kg (peso vivo) em 1960, para 18,4 Kg em 2009. Dos 126 milhões de toneladas, disponíveis para consumo humano em 2009, o consumo de peixe era menor em África, enquanto a Ásia foi responsável por dois terços do consumo total com 85,4 milhões de toneladas, dos quais 42,8 milhões foram consumidos fora da China [2].

Os valores *per capita* de consumo de peixe correspondentes a Oceânia, América do Norte, Europa, e América Latina e Caribe foram 24,6, 24,1, 22,0 e 9,9 Kg, respetivamente. Embora o consumo anual *per capita* de produtos da pesca tenha crescido nas regiões em

desenvolvimento, ainda é notável a diferença para as regiões mais desenvolvidas. Uma parte considerável do peixe consumido nos países desenvolvidos consiste em importações, e, devido à procura constante e produção local em declínio, está previsto um aumento das importações nos próximos anos [2].

A China, por exemplo, tem sido responsável pela maior parte do aumento de consumo de peixe no mundo. A sua participação na produção mundial de pescado cresceu de 7% em 1961 para 35% em 2010, impulsionada pelo aumento na diversidade de peixe disponível.

A tendência mundial no consumo de produtos de origem animal, mais concretamente do consumo de peixe, em todo o mundo, registou valores de 9 Kg *per capita* por ano em 1960 e de 16,7 Kg em 2006, estimando-se que este valor aumente para 17,0 Kg em 2020 [4].

Portanto, a aquacultura continua a ser a atividade de maior crescimento no setor produtivo de animais para consumo humano [5].

A intensificação da aquacultura tem levantado, porém, muitas reservas no que diz respeito à conservação dos recursos naturais envolventes. A utilização de recursos hídricos no setor deve estar associada a modelos de gestão ambiental, devendo ser acompanhada de medidas de prevenção e/ou controlo de contaminação aquática. Esta prática assume especial importância quando os compostos disseminados podem desencadear efeitos severos na biodiversidade e na saúde humana. [5]

1.2. Compostos presentes na aquacultura

Na produção de peixe através da aquacultura são utilizados diversos compostos químicos entre os quais se podem destacar antibióticos, parasiticidas, fertilizantes, anestésicos, hormonas, oxidantes e algicidas /herbicidas.

Os compostos químicos de utilização veterinária utilizados variam muito consoante o sistema de produção. Por exemplo, sistemas de produção de peixes ósseos necessitam, normalmente, de uma vasta gama de produtos químicos, enquanto os sistemas de moluscos raramente utilizam estes produtos. As preocupações atuais acerca do uso de produtos químicos na aquacultura recaem essencialmente nos seus efeitos potenciais na saúde humana e no ecossistema natural.

Na tabela 1 constam os potenciais riscos e o motivo de utilização dos vários tipos de compostos utilizados na aquacultura [6].

Tabela 1- Substâncias farmacologicamente ativas de utilização veterinária [6].

Tipo de composto	Exemplos de compostos	Potenciais riscos	Utilização química
Antibióticos	Oxitetraciclina (Terramicina); Sulfadimethocina-ormethiprim	Desenvolvimento de resistência microbiana; Presença de resíduos em alimentos	Utilizado no tratamento de várias doenças em peixes gato e salmão;
Parasiticidas	Cypermethin	Toxicidade aguda em organismos marinhos	Controlo de surto marinho de piolhos em salmão
	Carbaryl	Toxicidade aguda em organismos marinhos	
	Trichlorfon	Toxicidade aguda em organismos marinhos	Eliminação de parasitas existentes em lagoas ornamentais de peixes
	Formalin	Tóxico e irritante	Controlo de fungos e protozoários em peixes ósseos;
Fertilizantes	Nitrogénio, fósforo e mistura de oligoelementos	Contribuição para o enriquecimento nutricional	Estimulação da produção de algas em sistemas aquáticos
Anestésicos	Metanossulfonato	Cancerígeno	Anestesia de peixes ósseos
Oxidantes	Permanganato de potássio	Explosivo; Irritante durante manuseamento	Utilizado em sistemas aquáticos para eliminação de organismos patogénicos e fitoplancton
	Peróxido de hidrogénio	Irritante durante manuseamento;	
	Hipoclorito de cálcio	Tóxico; Irritante durante o manuseamento	
Algicidas e Herbicidas	Sulfato de cobre	Em grandes dosagens torna-se tóxico para a vida aquática; Irritante durante o manuseamento	Utilizado para reduzir o crescimento vegetal em sistemas aquáticos
	Cobre quelato	Em grandes dosagens torna-se tóxico para a vida aquática	
	Simazina	Efeitos nocivos no fígado e na tiróide em humanos; Cancerígeno	
	2,4 - D	Efeitos nocivos nos rins no fígado e no sangue animal; Cancerígeno	
	Brometo de Diquato	Efeitos nocivos nos rins em humanos	
	Ricioniolate de potássio	Efeitos mínimos.	

Os antibióticos encontram-se nos principais compostos utilizados na aquacultura, que apresentam risco potencial para a saúde humana.

1.2.1. Antibióticos na aquacultura

Os antibióticos têm sido utilizados em produção animal, incluindo aquacultura, para prevenção e tratamento de doenças infecciosas. A administração de antibióticos tem um impacto sobre o ambiente que pode conduzir ao aparecimento de resistência antimicrobiana com a possível disseminação de genes resistentes entre diversas populações bacterianas. A capacidade de transferência horizontal de genes resistentes aos antimicrobianos de bactérias ambientais aquáticas, como *Aeromonas salmonicida*, para bactérias, como *Escherichia coli*, tem sido documentada. A transmissão do animal para o homem pode ocorrer por vários meios, incluindo contacto direto com animais e fezes, bem como ingestão de alimentos e água. O uso excessivo e não controlado de antibióticos em animais tem importantes consequências na saúde pública, tendo transformado a resistência aos antibióticos num importante problema global. As mudanças no sistema de produção podem aumentar a importância da difusão de resistências no meio ambiente, se a produção se tornar mais integrada ou mais intensiva em áreas geográficas de menores dimensões [7].

A tabela 2 resume os principais agentes antimicrobianos utilizados na aquacultura mundial e a sua importância na medicina humana. Assim, entre os agentes antimicrobianos comumente utilizados em aquacultura, vários são classificados pela Organização Mundial da Saúde como criticamente importantes para utilização em medicina humana. A resistência aos antibióticos limita severamente as opções em medicina humana, e, portanto, a utilização destes agentes em animais deve ser evitada ou controlada a fim de prevenir a disseminação de resistência a antimicrobianos [8].

Tabela 2 - Principais agentes antimicrobianos utilizados na aquacultura e a sua importância na medicina humana [8]

Agente antimicrobiano (classe de antibiótico)	Via de administração em aquacultura	Importância da classe em medicina humana
Amoxicilina (aminopenicilinas)	Oral	Elevada
Ampicilina (aminopenicilinas)	Oral	Elevada
Cloranfenicol (fenicol)	Oral/banho/injetável	Importante
Florfenicol (fenicol)	Oral	Importante
Eritromicina (macrólidos)	Oral/banho/injetável	Elevada
Estreptomicina, neomicina (aminoglicosídeos)	Banho	Elevada
Furazolidona (nitrofuranos)	Oral/banho	Importante
Nitrofurantoína (nitrofuranos)	Oral	Importante
Ácido oxolínico (quinolonas)	Oral	Elevada
Enrofloxacina (fluoroquinolonas)	Oral/banho	Elevada
Flumequina (fluoroquinolonas)	Oral	Elevada
Oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina (tetraciclinas)	Oral/banho/injetável	Muito importante
Sulfonamidas	Oral	Importante

Os fluorquinolonas (FQ) são derivados piperazinil das quinolonas (figura 1) e são utilizadas atualmente na medicina humana e veterinária, como agentes antibacterianos contra várias doenças [9-11]. Elas são consideradas quinolonas de segunda geração com maior eficácia. Ambas apresentam a mesma estrutura, baseada em dois anéis, onde o grupo carboxílico e o cetona são responsáveis pela atividade antibacteriana por inibição da DNA girase, enquanto os substituintes nas posições 1 e 7 influenciam a sua eficácia [12].

O uso de FQ em vez de quinolonas tem aumentado nos últimos anos, incluindo-se aqui a Norfloxacin (NOR). Os benefícios da utilização destes antibióticos na medicina são óbvios, mas a utilização abusiva nos últimos anos levaram à acumulação de resíduos a diferentes níveis ambientais, aumentando assim o risco de crescimento e promoção de bactérias resistentes a estes antibióticos [13-15]. Os seus resíduos são potencialmente persistentes [14], podendo ser encontrados em peixe [15,16] pelo que a sua utilização deve ser sujeita a um rigoroso controlo analítico, por meio de técnicas apropriadas.

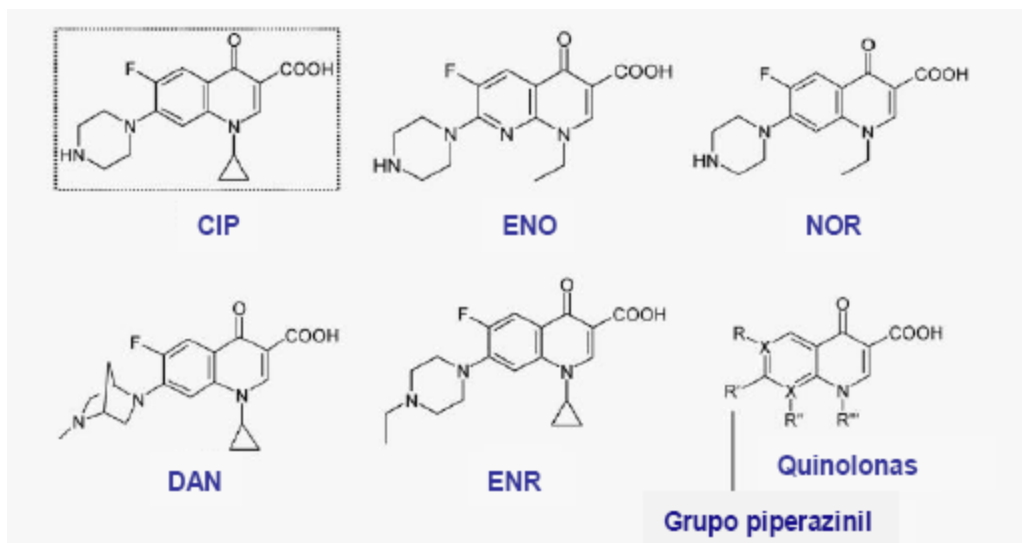


Figura 1 - Estrutura molecular de fluorquinolonas e quinolonas: ciprofloxacina (CP), enofloxacina (ENO), NOR, enrofloxacina (ENR). [17].

1.3. Métodos analíticos para detecção de antibióticos em aquacultura

Têm sido descritas na literatura diversos métodos para determinação de antibióticos em diferentes matrizes e a diferentes níveis de concentração. Entre os diferentes métodos pode-se destacar vários que recorrem a técnicas eletroanalíticas, óticas e separativas.

1.3.1. Métodos óticos

Os métodos óticos envolvem uma interação da matéria com a radiação eletromagnética. Parte da radiação eletromagnética pode ser absorvida e parte da radiação pode se dispersa ou reemitida, com ou sem variação do comprimento de onda. Também podem ocorrer variações nas propriedades da radiação absorvida, tal como uma mudança de direção num estado de polarização. Os fenômenos óticos existentes incluem a absorção, emissão, difração, dispersão, reflexão e polarização, em toda a gama do espectro eletromagnético, desde o raio X até as microondas.

A base generalizada da análise espectrofotométrica de absorção é a medida da fração de radiação que é absorvida ao longo de uma gama alargada de espectro eletromagnético. Muitos sistemas químicos podem ser excitados pela radiação eletromagnética e reemitir ao mesmo tempo a outro comprimento de onda. Estes sistemas denominam-se por fotoluminescentes, dentro dos quais se poderão distinguir os fluorescentes e os fosforescentes. Estes dois tipos de fotoluminescência são produzidos por mecanismos diferentes, cessando na fluorescência a emissão logo após a interrupção da incidência da

radiação, ao contrário da fosforescência em que aquela perdura durante um curto intervalo de tempo, depois de a radiação incidente ter sido interrompida. A radiação emitida pode situar-se na zona do visível, ultravioleta, ou noutras gamas mais energéticas do espectro, como a do raio X [18-20].

A intensidade de radiação fluorescente permite determinar quantitativamente vestígios de muitas espécies orgânicas e inorgânicas, tendo o método limites de detecção muito baixos, geralmente na ordem dos ppb (parte por bilião). Contudo, esta técnica não é tão aplicada como os métodos de absorção porque só um número mínimo de sistemas emite radiações fluorescentes. A fosforescência é ainda menos utilizada sob o ponto de vista analítico, por motivos semelhantes.

1.3.2. Métodos separativos

Os métodos instrumentais separativos pressupõem uma separação dos constituintes de interesse na amostra, antes de ser efetuada a medida analítica propriamente dita. As técnicas utilizadas neste domínio são a cromatografia e a eletroforese.

A cromatografia é essencialmente um método físico de separação em que os componentes a separar são distribuídos entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. Tal como o próprio nome indica, a fase estacionária é aquela que se encontra fixa, ancorada numa coluna, e a fase móvel é a que se movimenta, contactando intimamente com a fase estacionária ao longo da trajetória desse movimento. A separação ocorre em resultado de processos repetidos de adsorção e dessorção durante o movimento dos componentes da amostra, ao longo da fase estacionária, sendo devida à diferença de constantes de distribuição de cada um dos componentes da amostra.

Os métodos cromatográficos são morosos (envolvendo períodos de tempo longos no tratamento das amostras e no traçado da curva de calibração), dispendiosos (devido à pureza elevada dos reagentes utilizados e ao elevado custo do equipamento e da manutenção associada), e tóxicos para o meio ambiente (as fases móveis são geralmente solventes orgânicos).

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica que consiste no transporte de partículas carregadas, por aplicação de um campo elétrico, e que utiliza tubos capilares para obter uma alta eficiência de separação, quer de moléculas grandes, quer de moléculas pequenas. Estas separações são facilitadas por altas voltagens, as quais geram fluxos eletro-osmóticos

e eletroforéticos de soluções tampão e de espécies iônicas, respetivamente, dentro do capilar [21-23].

Para o doseamento de NOR é possível encontrar métodos cromatográficos [23,24], baseados em fenómenos de separação. Estes métodos são simples, rápidos e sensíveis na determinação simultânea de várias FQ. Não se encontram referenciados na literatura métodos eletroforéticos para determinação de NOR em águas ambientais.

Genericamente, os métodos baseados em técnicas separativas fornecem resultados analíticos de boa precisão e exatidão. Numa perspetiva da sua aplicação ao controlo de rotina, é importante referir a necessidade de estabelecer alguns procedimentos, que podem ser complexos, antes de se proceder à introdução das soluções a ensaiar no sistema separativo.

Neste sentido, a implementação destas metodologias em controlo analítico de rotina poderá não ser a mais adequada, pela impossibilidade de realização de análises expeditas. Em alternativa, encontram-se também os métodos eletroanalíticos na literatura.

1.3.3. Métodos eletroanalíticos

Nos métodos eletroanalíticos, a informação sobre a solução em estudo é obtida pela medida de uma propriedade de natureza elétrica. Estes métodos apresentam algumas vantagens relativamente a outros métodos instrumentais. As medidas são, na sua maioria, seletivas para um determinado elemento e o equipamento requerido é pouco dispendioso. Para além disso, estes métodos permitem obter informação quantitativa para quantidades de analíto, muitas vezes, vestigiais.

São diversas as estratégias instrumentais no campo eletroanalítico, dando origem a múltiplas técnicas, entre as quais podemos destacar a potenciometria.

1.4. Potenciometria

A potenciometria é um método eletroquímico que envolve a determinação da diferença de potencial entre um eléctrodo indicador e um de referência, ou entre dois eléctrodos de referência separados por uma membrana de permeabilidade seletiva, quando não houver corrente significativa (próxima do zero – método estático) a fluir entre eles (figura 2).

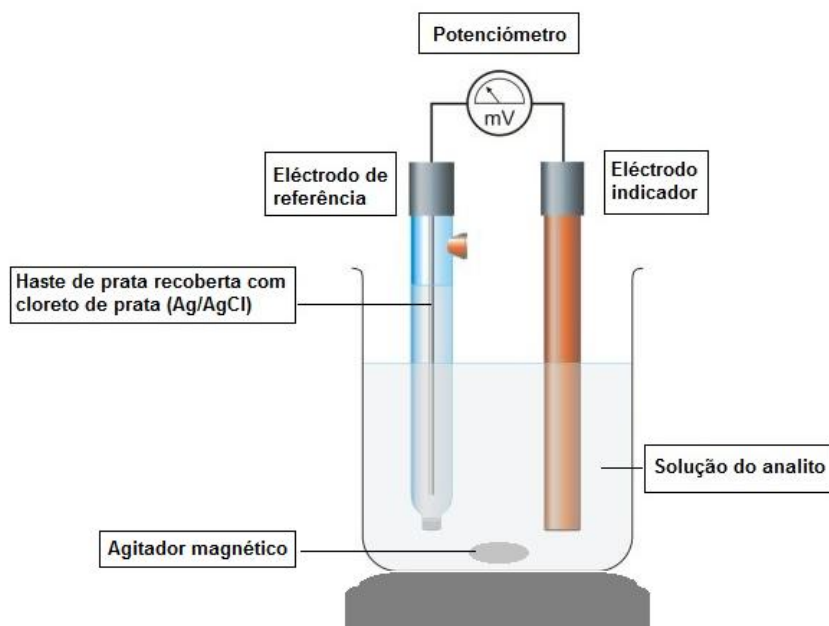


Figura 2 - Célula eletroquímica com análise da potenciométrie com recurso a um ESI [25]

1.4.1. Eléttodos

Eléttodo de referência

O eléttodo de referência deve manter um valor de potencial constante e estável, uma vez que serve de comparação ao eléttodo indicador. Além disso, o eléttodo de referência ideal, deve ser reversível; retomar o valor de potencial original após submetido a pequenas correntes; exibir baixa histerese, i.e., baixa variação de potencial com as variações de temperatura, regressando ao valor inicial após o restabelecimento da temperatura inicial e não deve polarizar, de modo a fornecer um valor de potencial que é independentemente da corrente que passe.

O eléttodo de referência mais utilizado é o de AgCl/Ag, face à sua simplicidade, potencial constante e baixo custo de produção. É constituído por um fio de prata com revestimento electrolítico de uma fina camada de cloreto de prata, imerso numa solução de cloreto de potássio (KCl) saturado com cloreto de prata (AgCl) [26,27].

Eléttodo indicador

O eléttodo indicador é aquele cujo potencial depende da atividade da espécie eletroativa. O eléttodo indicador ideal é aquele que, para uma pequena variação de concentração do analito, promove uma grande variação na diferença de potencial, dentro dos valores teoricamente esperados. Além disso, o eléttodo indicador ideal deve apresentar um alto

grau de reprodutibilidade; uma grande seletividade e uma resposta rápida à variação da concentração da espécie.

Os elétrodos indicadores mais comuns são os elétrodos seletivos de ião (ESIs) [26,27]. Estes elétrodos apresentam uma membrana seletiva que permite discriminar seletivamente uma determinada espécie iónica. O potencial interno da membrana pode ser estabelecido através de um contacto sólido ou líquido. O contacto líquido implica a colocação da membrana entre dois compartimentos líquidos: a solução da amostra e a solução de referência interna, tipicamente uma solução do ião a medir, na qual se mergulha um fio de prata que serve de contacto elétrico. O contacto sólido implica a deposição da membrana sobre um suporte sólido condutor.

Embora os elétrodos seletivos de ião de contacto líquido permitam uma manipulação mais eficaz das características de funcionamento dos elétrodos, como o limite de deteção, os elétrodos de contacto sólido são mais eficazes para medidas no local, uma vez que a manipulação dos elétrodos não requer cuidados especiais[26,27].

1.4.2. Base teórica

De acordo com as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), a diferença de potencial da célula eletroquímica de um ESI é linearmente dependente do logaritmo da atividade do ião alvo na solução, de acordo com a equação de *Nernst-Nicolski* (equação 1) [28].

$$\Delta E = \text{"constante"} + \frac{2.303 RT}{z_A F} \log a_A, \quad (1)$$

Em que:

ΔE - força electromotriz (f.e.m.) de uma célula electroquímica, definida como sendo a diferença de potencial do ESI e do elétrodo de referência
 R - constante universal dos gases (8.314 J/(K×mol));
 T - temperatura em Kelvin;
 F - constante de Faraday (9.6485×10⁴ C/mol);
 z_A - carga do ião principal, A;
 a_A - a atividade do ião A expressa em mol/L ou mol/kg;
 “constante” corresponde ao valor de f.e.m. que inclui o potencial normal do ESI, do elétrodo de referência e da junção líquida, expressa em mV.

A equação 1 tem por base a atividade, “a”, em vez da concentração, “c”, da espécie iónica a medir presente na solução. O cálculo de atividade implica porém a identificação de alguns parâmetros, tais como o “tamanho iónico” do ião específico da solução de ensaio, cujo valor

é desconhecido para a maioria das espécies iónicas de carácter orgânico em solução aquosa. Considerando que a substituição de “a” por “c” é possível em condições de força iónica ajustada, as medidas potenciométricas são realizadas num valor de valor de força iónica (I , equação 2) fixado a um valor elevado e constante.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (2)$$

De uma forma simples, a força iónica corresponde à intensidade do campo eléctrico na presença do iões em solução, considerando c_i : concentração do ião, expressa em mol/L; e z_i : carga desse ião [29].

1.4.3. Curva de calibração

A curva de calibração corresponde ao traçado gráfico do logaritmo c da concentração de um ião alvo em função da f.e.m. da célula eletroquímica. A partir da análise da curva de calibração (figura 3), é possível obter informações tais como o limite de detecção (LD), limite inferior de resposta linear (LIRL) e declive.

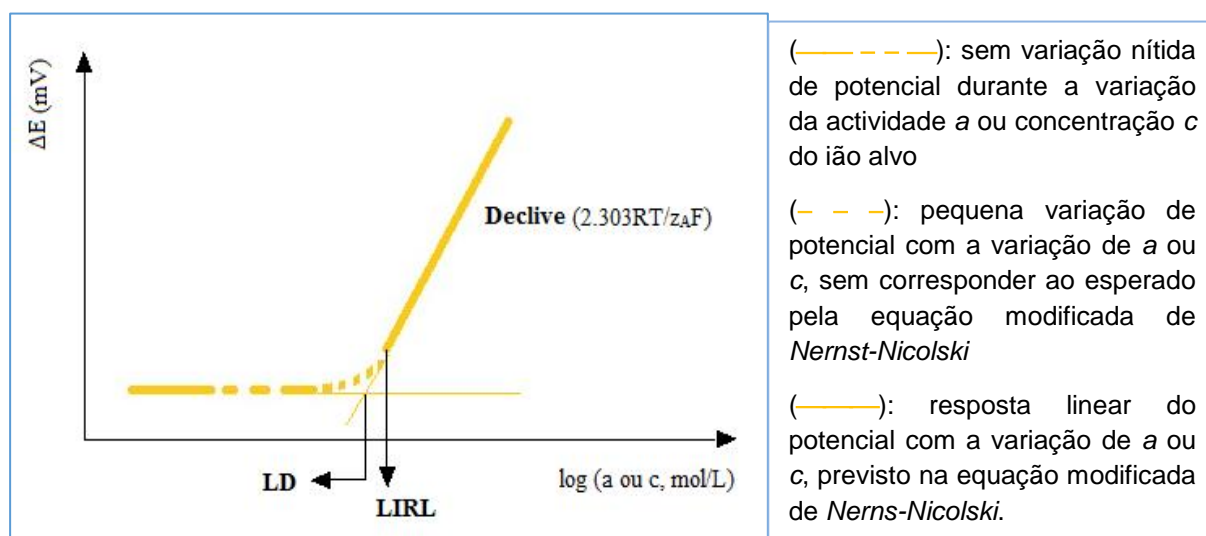


Figura 3 - Curva de calibração de um ESI

O LD é definido como a concentração de um ião alvo no ponto de intersecção entre dois segmentos de reta extrapolados. O comportamento linear a partir de uma dada concentração de um ião alvo é designado como LIRL. O declive resultante da curva de calibração demonstra a sensibilidade da célula, bem como a sua qualidade em termos de resposta. O valor teórico de declive experimental sob condições normais de pressão e temperatura deverá ser igual a $59.16/z_A$ mV/década [29, 30].

1.4.4. Tempo de resposta

O tempo de resposta corresponde ao período de tempo durante o qual o elétrodo de referência e o ESI estão em contacto com uma amostra de solução com o ião alvo, ou em que a ou c do ião em solução é alterada, e o primeiro instante no qual o declive $\Delta E/\Delta t$ iguala o valor limite seleccionado (Δt), de acordo com a figura 4.

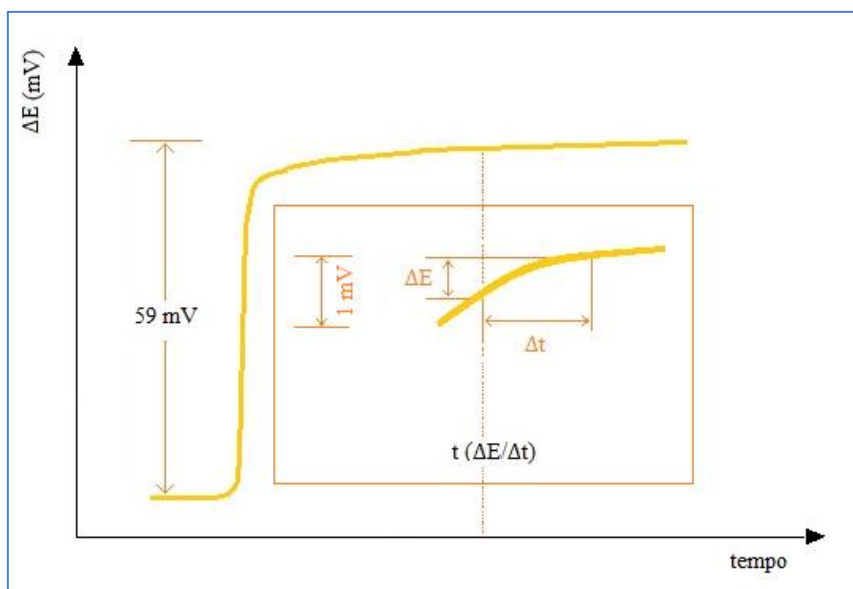


Figura 4 - Representação gráfica do tempo de resposta t , ($\Delta E/\Delta t$).

A escolha do valor limite advém de questões de ordem experimental ou da exatidão desejada para a leitura potenciométrica. O tempo de resposta dos ESIs depende, geralmente, da concentração absoluta presente na solução, bem como da variação de c do ião ($C_{inicial} - C_{final}$) incorporada no sistema [29,30].

1.4.5. Drift

O *drift* corresponde a uma mudança lenta e não aleatória da diferença de potencial da célula ESI ao longo do tempo, numa solução com temperatura e composição constante. A determinação do *drift* é efectuada através de uma curva linear com encaixe no conjunto de dados recolhidos durante um determinado período de tempo numa solução. O declive da linha do potencial *versus* tempo é denominado *drift*. Os desvios aleatórios de potencial em torno da linha definem o desvio-padrão dos dados medidos [29,30].

1.4.6. Efeito de pH

De uma forma geral, os ESI têm a capacidade de detetar um ião seletivamente, mas outros iões que co-existam que na amostra podem ter a capacidade de alterar resposta potenciométrica, atuando como interferentes.

É de extrema importância utilizar soluções padrão de ajuste de pH, optando por ter sempre um mesmo valor de pH com o intuito de minimizar as interferências na resposta potenciométrica, através do controlo da atividade dos iões H^+ e HO^- e da força iónica.

A gama de valores de pH a escolher para a calibração pode ser determinada por curvas de calibração efetuadas em diferentes valores de pH, ou pelo traçado de diagramas de Reilley, onde o valor de potencial é monitorizado continuamente face à variação de pH da solução.

Além do estudo do efeito do pH, são necessários estudos mais profundos de seletividade a fim de verificar a capacidade do ESI discriminar o ião para o qual é seletivo quando na presença de outros iões [29, 31].

1.4.7. Seletividade

A seletividade de um complexo potenciométrico traduz a sua capacidade de distinção, em solução, do ião para o qual o ESI é seletivo. A equação modificada de *Nikolski-Eisenman* (equação 3) expressa o potencial de um ESI numa solução que contém o ião principal, A, e o ião interferente, B.

$$E = \text{"constante"} + \frac{2.303 RT}{z_A F} * \log [a_A + \sum_i K_{A,B}^{pot} [a_{Bi}]^{\frac{z_A}{z_{Bi}}}] \quad (3)$$

Em que:

- E - valor experimental do potencial do ESI
- R - constante dos gases perfeitos (8.3144 J/(K×mol))
- T - temperatura termodinâmica em Kelvin;
- F - constante de Faraday (9.6485×10⁴ C/mol);
- a_A - atividade do ião interferente, expressa em mol/L ou mol/kg
- z_A - carga do ião principal, A
- z_B - carga do ião interferente, B;
- “constante” - potencial de junção líquida, expressa em mV
- $K_{A,B}^{pot}$ - coeficiente de seletividade potenciométrica do ião interferente.

1.5. Polímeros de impressão molecular

O conceito de impressão molecular surgiu com o intuito de produzir uma estrutura rígida tridimensional (um polímero) ao redor de uma molécula molde (*template*) que pudesse efetuar seletivamente o reconhecimento molecular. Estes polímeros são atualmente conhecidos como polímeros de impressão molecular (MIP, do inglês *molecularly imprinted polymers*). O processo geral que se encontra associado a esta impressão encontra-se representado na figura 5. Para a construção do MIP, uma molécula utilizada como molde interage, por meio de ligação covalente ou não covalente, com as moléculas do monómero. Depois, é adicionado ao meio um agente reacional que promove ligações cruzadas no polímero com a finalidade de promover uma matriz polimérica rígida. A reação de polimerização inicia-se após a adição de um iniciador, tipicamente radicalar. Por fim, é feita a remoção da matriz polimérica por meio de solvente ou, por meio de clivagem química se a molécula estabelecer ligação covalente com o monómero. [27,32]

Os polímeros assim obtidos são polímeros molecularmente impressos, química e mecanicamente estáveis, com locais de reconhecimento complementares e reconhecimento seletivo do modelo durante os procedimentos de religação subsequentes. A impressão molecular é adquirida através da distribuição tridimensional de grupos funcionais e governada por interações eletrostáticas entre os monómeros e o modelo. Estas interações podem envolver ligações fortes, de natureza covalente, ou interações mais fracas, de natureza não-covalente, como as ligações de hidrogénio, as forças de *Van-der-Waals*, as interações iónicas e as interações hidrofóbicas [33-37].

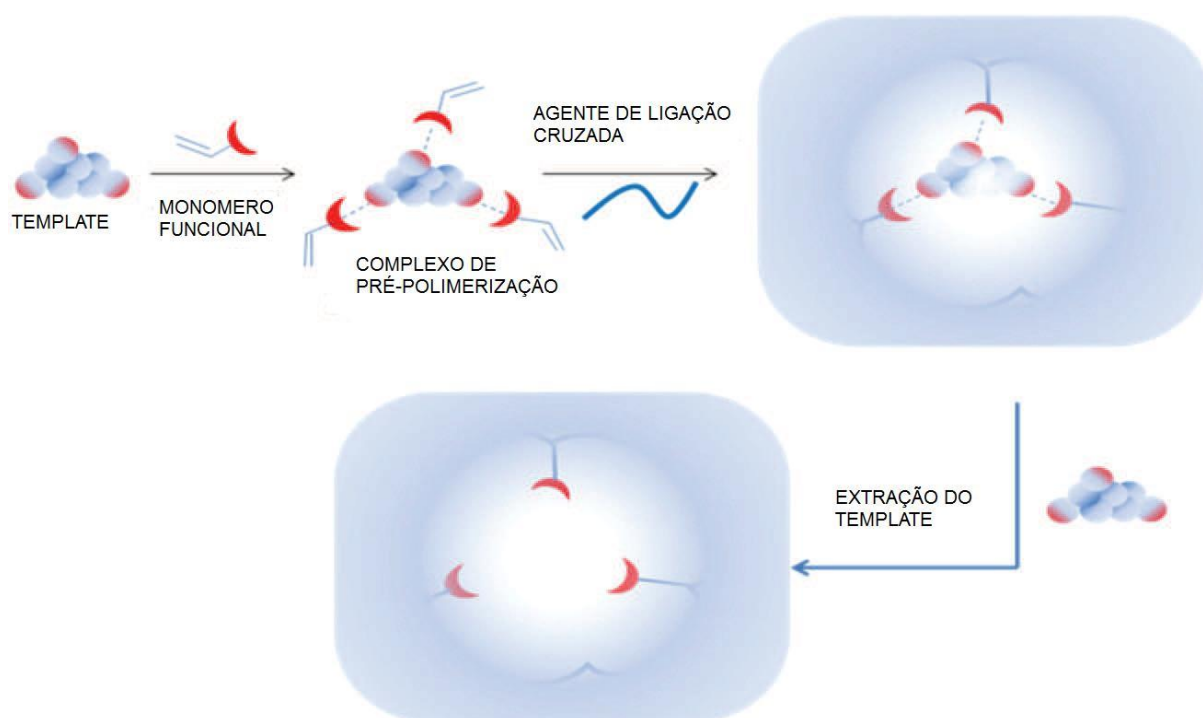


Figura 5 - Representação esquemática do processo de impressão molecular. [38]

Os MIP apresentam diversas vantagens, entre as quais se podem destacar a especificidade, reutilidade (sem perda de performance), fácil preparação, relação custo-eficácia, estabilidade e seletividade molecular [36,37,39]. Possuem ainda elevada resistência a condições extremas, como temperaturas elevadas e pressões, ambientes ácidos, básicos, iões metálicos e solventes orgânicos [38-41].

Atualmente, os materiais MIP já detêm uma grande eficiência para o reconhecimento/captura de biomoléculas de baixo peso molecular, como aminoácidos, antibióticos, pesticidas, pequenos contaminantes ambientais e alimentares, etc. [39].

De uma forma geral, a impressão molecular é uma técnica promissora de atribuição de reconhecimento molecular pré-determinado para materiais adequados que podem reconhecer, e em alguns casos responder, a agentes químicos e biológicos, provando ser de grande utilidade para o desenvolvimento de sensores [37].

1.5.1. Síntese

A preparação dos MIP é feita, convencionalmente, pelo método conhecido por polimerização em “*bulk*”, onde a reação é realizada em sistema homogêneo. A reação é conduzida num recipiente fechado contendo monómero, analito, solvente, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar. A reação ocorre na ausência de oxigénio sob fluxo de N₂ ou Ar e induzida com aquecimento e/ou radiação UV. O oxigénio deve ser eliminado do meio reacional, pois retarda a reação de polimerização radicalar. No final, o sólido polimérico resultante é moído, peneirado e submetido a uma lavagem com solvente para extração do analito, visando seu uso posterior (Figura 6) [38].



Figura 6 – Representação do procedimento de preparação do MIP recorrendo ao método de polimerização em “*bulk*” [38].

A escolha dos reagentes é ditada pela natureza da interação do analito com o monómero. Se a interação ocorrer por ligação de hidrogénio, é recomendado que a polimerização seja feita a baixas temperaturas e, nestas circunstâncias, os iniciadores radicalares ativos fotoquimicamente são mais indicados [38].

O primeiro passo para síntese dos MIP consiste em estabelecer criteriosamente a escolha do monómero e do analito. O analito necessita conter em sua estrutura molecular grupos funcionais capazes de interagir fortemente com os monômeros, a fim de formar uma espécie de complexo estável. Como já mencionado, a interação analito-monómero pode se dar por meio de ligação covalente ou não covalente, por meio de ligação de hidrogénio, interação dipolodipolo, interação iônica ou por interação hidrofóbica. Polímeros preparados por ligação covalente possuem sítios mais seletivos, dada a uniformidade gerada nos mesmos. Por outro lado, quando esta estratégia é adotada, a necessidade do uso de monômeros e analitos que estabeleçam ligações covalentes restringe a aplicabilidade dos MIP para poucos analitos. Adicionalmente, estudos têm mostrado que tais polímeros apresentam uma

cinética lenta de retenção dos analitos na cavidade do polímero. Por outro lado, polímeros preparados a partir de ligações não covalentes frequentemente apresentam diâmetros de partículas e sítios seletivos menos uniformes. Porém, apesar destas desvantagens, esta abordagem de preparo é mais utilizada, dada a maior flexibilidade de aplicação dos MIP para diferentes analitos [38].

2. Descrição Experimental

Neste capítulo são abordadas as metodologias envolvidas na síntese do material sensor e construção do biossensor, avaliação do desempenho analítico dos dispositivos obtidos e aplicação analítica em água dopada.

2.1 Reagentes

A água utilizada para a preparação das soluções aquosas foi ultra-pura, com uma condutividade igual ou inferior a $0,054 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 25°C .

As soluções aquosas mais concentradas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes e posterior dissolução e diluição num solvente apropriado.

A norfloxacin (NOR), o tetrakis (4-clorofenil) borato de potássio (TpCIPB^-), 2-nitrofenilótil éter (oNPOE) e o poli (cloreto vinilo) de alto peso molecular (PVC) utilizados foram produzidos pela Fluka; o tetrahidrofurano (THF), o ácido 4-(2-Hidroxietyl)piperazino-1-etanosulfónico (HEPES, 99,5%) e a sílica gel funcionalizadas com 3-aminopropil comercializados pela Sigma-Aldrich; o cloreto de ferro (III) hexahidratado e o acetonitrilo (ACN) foram produzidos pela Scharlau; o pirrol (Py) e a tetrametiletilenodiamina (TEMED) comercializados pela TCI; o tampão fosfato salino (do inglês Phosphate Buffered Saline, PBS) da marca Amresco; o persulfato de amónia (APS) da JVP e o MES da Alfa Aesar.

2.2 Material e equipamentos

As soluções de concentração rigorosa foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com 5,00, 10,00, 50,00, 100, 250,00 e 500,00 mL de capacidade total. Na medição destes volumes foram utilizadas pipetas automáticas de volume regulável, VWR 2 – 20 μL ; BioHit, 20 - 200 μL , 100 – 1000 μL ; 1-5 mL e SOCOREX, entre 20- 200 μL . As pesagens dos reagentes foram efetuadas na balança RADWAG XA 110/X, com uma precisão de $\pm 0,0001$ g.

Com o objetivo de minimizar o tempo de dissolução de algumas substâncias sólidas recorreu-se ao banho de ultrassons termostaticado, Selecta UltraSons H-D,. A secagem de materiais foi realizada em exsiccador com atmosfera de azoto.. A homogeneização de soluções/suspensões foi realizada em placa de agitação Reypa e a separação da fração sólida numa centrífuga Labnet.

A célula potenciométrica foi constituída pelo elétrodo de trabalho e pelo elétrodo de referência (fio de prata), ambos construídos no laboratório. A diferença de potencial entre

estes dois elétrodos foi medida num potenciómetro Crison GLP21 (sensibilidade $\pm 0,1$ mV), que continha um agitador magnético acoplado. O sinal de saída do potenciómetro foi ligado a um ponto de comutação com seis saídas, o que permite a leitura simultânea de seis elétrodos seletivos.

A caracterização dos materiais e das membranas dos elétrodos seletivos foi realizada através de um espectrómetro de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês Fourier Transformed Infrared Spectroscopy, FTIR), da Thermo Scientific, Nicolet iS10, e por espectroscopia de Raman com microscopia confocal, da Thermo Scientific, DXR.

A avaliação das superfícies dos materiais sensores preparados foi realizada por uma análise de SEM/EDS, através de um microscópio eletrónico de varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky), com microanálise por raios X e análise de padrões de difracção de elétrões retrodifundidos, FEI Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M.

2.3 Preparação do material sensor

A preparação de materiais impressos, MIP, foi realizada em *bulk*, tendo-se preparado em paralelo materiais de controlo não impressos, NIP, recorrendo aos mesmos procedimentos mas na ausência da norfloxacin.

Preparação do MIP com monómero funcional pirrol (M Py)

Para a preparação de polímeros de impressão molecular (MIP) a molécula molde NOR (0,05M) foi colocada num gobelé, juntamente com o monómero funcional pirrol (0,10M), o catalisador tetrametiletenodiamina (0,005M) e o iniciador persulfato de amónio (0,01M). A mistura foi dissolvida em 50 mL de acetonitrilo. A mistura de polimerização foi dissolvida num banho de ultra-sons termostaticado e depois desgaseificada com nitrogénio durante 5 minutos. O polímero foi lavado posteriormente com acetonitrilo de forma a extrair o analíto, sendo depois seco no excicador em ambiente de azoto.

Todo este processo encontra-se esquematizado na figura 7.

O polímero sem impressão molecular (NIP) foi preparado da mesma forma mas com a molécula molde excluída do procedimento.

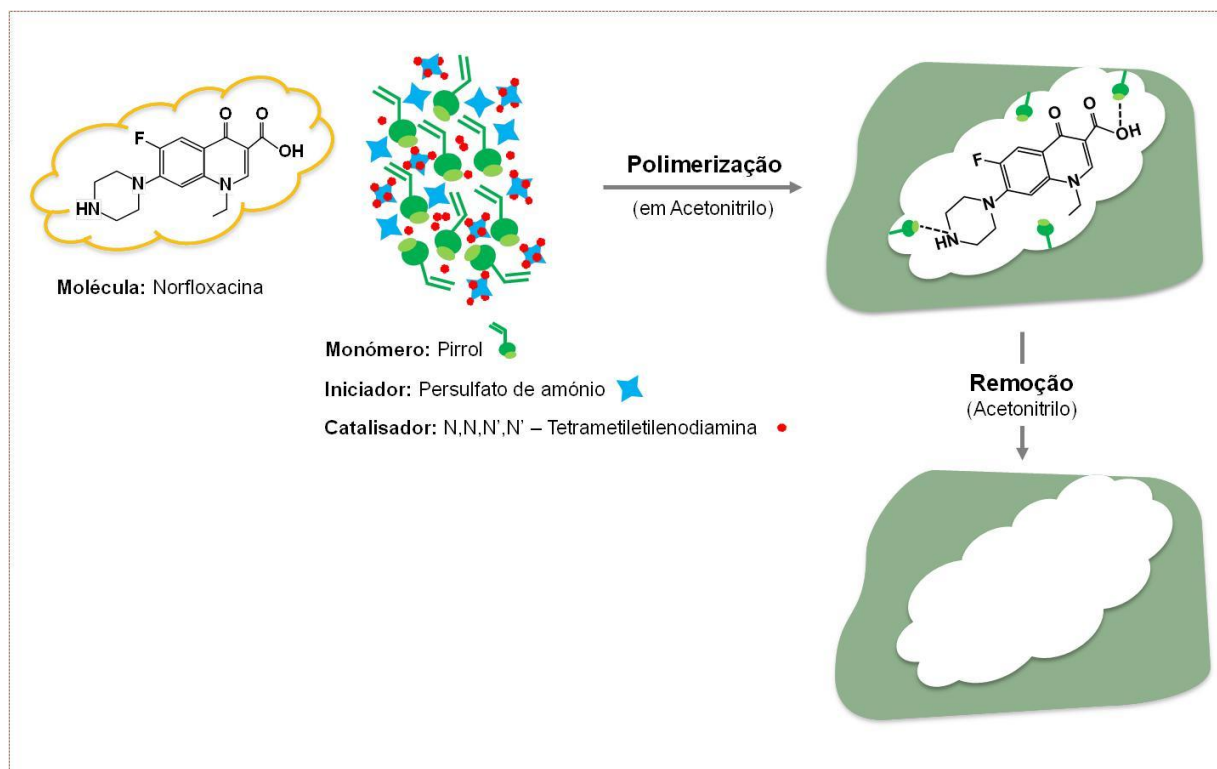


Figura 7- Representação esquemática do processo de preparação do M Py

Preparação do MIP com monómero funcional sílica-polipirrole (M Si-Py)

Iniciou-se a preparação do polímero de impressão molecular (MIP) com a colocação de 0,05g de nanopartículas de sílica gel funcionalizadas com 3-aminopropil numa solução de 50 mL de catalisador tetrametiletilenodiamina (0,005M) e iniciador persulfato de amônio (0,01M) em acetonitrilo. Esta solução manteve-se em agitação magnética durante 24h à temperatura ambiente. As partículas depositadas resultantes deste procedimento foram lavadas em acetona de forma a retirar os excessos de sílica. Posteriormente adicionou-se uma solução de 10 mL de molécula molde NOR (0,05 M) juntamente com o monómero funcional pirrol (0,10M) em acetonitrilo. Esta solução foi mantida em agitação magnética durante 6h à temperatura ambiente, resultando num precipitado cinzento. O polímero foi lavado posteriormente com acetonitrilo de forma a extrair o analíto, tal como se pode verificar no processo esquematizado na figura 8.

O polímero sem impressão molecular (NIP) foi preparado da mesma forma mas com a molécula molde excluída do procedimento.

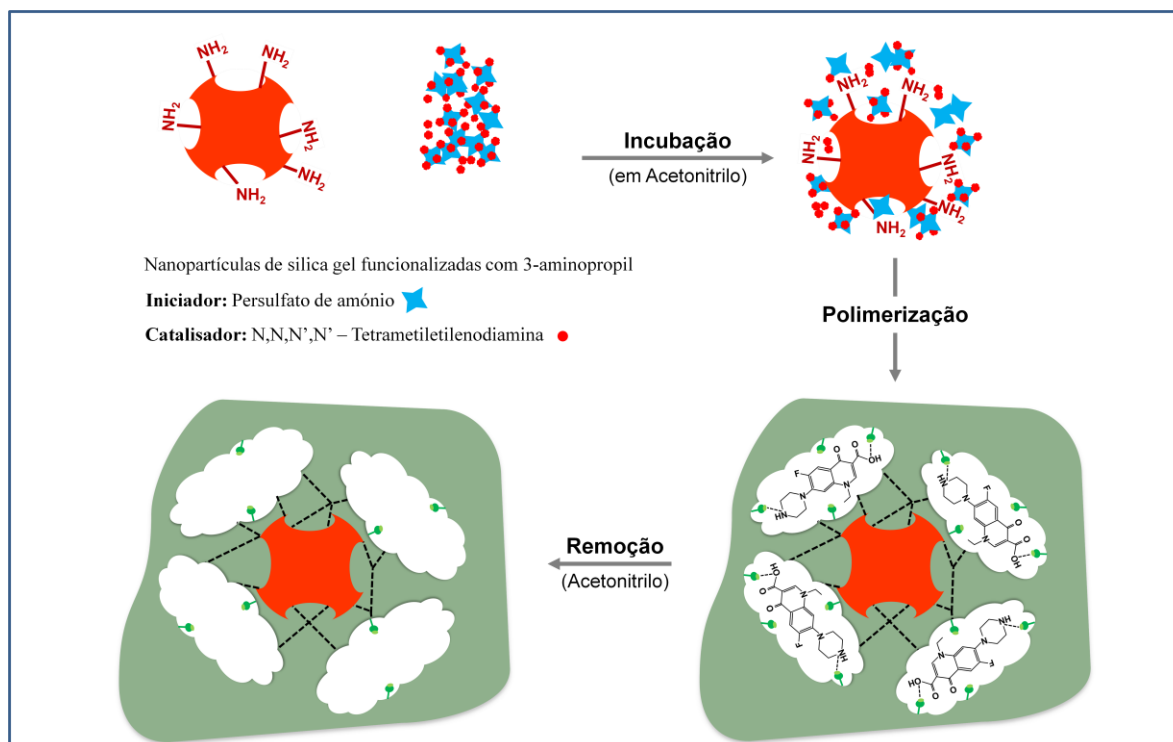


Figura 8 - Representação esquemática do processo de preparação do M Si-Py

De forma a confirmar a ausência de NOR após o processo de remoção fez-se uma despistagem rápida através de um método colorimétrico já descrito na literatura [4]. O método consistiu na avaliação através da utilização de uma espécie metálica, Fe (III) (1×10^{-4} M), que em meio ácido (pH 3) e na presença de NOR forma um complexo alaranjado, tal como se verifica na figura 9.

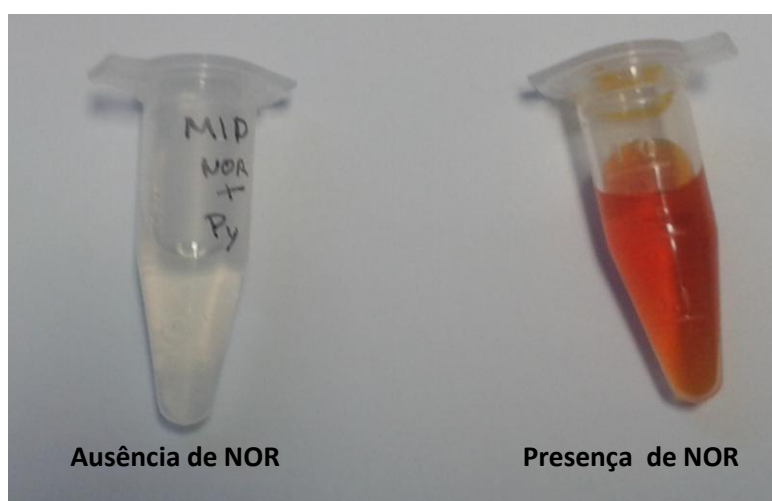


Figura 9 - Confirmação da ausência/ presença de NOR por método colorimétrico

2.4 Caracterização dos materiais sensores

Os materiais sensores mencionados neste trabalho, MIP's (MIP PY e MIP Si-PY), NIP's (NIP PY e NIP Si-PY) e controlos (NOR e nanopartículas de sílica aminada), foram sujeitos a análise de microscopia eletrónica SEM, realizada à temperatura ambiente e no modo de baixo vácuo. Os materiais sensores, secos, foram depositados sob uma fita-cola de carbono de dupla face, de modo a permitir uma boa aquisição de imagem das características microestruturais das amostras.

De forma a complementar a caracterização dos materiais sensores foi realizada uma análise de FTIR, a partir da qual foram traçados os respetivos espectros. Este traçado foi concretizado diretamente sobre as amostras, recorrendo-se à utilização do acessório de Refletância Total Atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*).

A análise pelo FTIR dos materiais sensores foi realizada colocando o material sólido diretamente sobre o cristal de germânio central do acessório de refletância difusa atenuada (do inglês, *Attenuated Diffuse Reflectance*, ATR). Todos os espectros foram colhidos em condições de controlo de temperatura/humidade, e expressaram a média da aquisição consecutiva de 250 espetros. O intervalo de números de onda (eixo x) variou entre 600 e 4000 cm^{-1} e o sinal obtido (eixo Y) foi representado em % de transmitância. A resolução foi igual a 4000.

2.5 Preparação das membranas seletivas e construção dos eletrodos

Os materiais sensores utilizados na preparação de 7 membranas seletivas constam na tabela 3 e a constituição e composição de cada uma das membranas estão indicadas na tabela 4. Cada membrana continha material sensor, MIP ou NIP, solvente mediador plastificante (oNPOE) e PVC. As membranas poderiam ainda conter um aditivo, tetrakis(4-clorofenil)borato de potássio). Para efeito de controlo, foi ainda preparada uma membrana sem material sensor e com tetrakis(4-clorofenil)borato de potássio), chamada AdA (-). Foi feita a dissolução/suspensão dos materiais referidos em 3 mL de solvente THF, acompanhada de agitação magnética.

Tabela 3 - Constituição e composição das membranas seletivas

Membranas	Material sensor	Eléctrodo Seletivo de Ião (ESI)
Membrana 1	MIP de pirrol (MPy)	ESI 1
Membrana 2	MIP de pirrol com Aditivo Aniónico (AdA) (MPyAdA)	ESI 2
Membrana 3	NIP de pirrol (NPy)	ESI 3
Membrana 4	MIP com nanopartículas de sílica e pirrol (MSiPy)	ESI 4
Membrana 5	MIP com nanopartículas de sílica e pirrol com AdA (MSiPyAdA)	ESI 5
Membrana 6	NIP com nanopartículas de sílica e pirrol (NSiPy)	ESI 6
Membrana 7	Controlo sem material sensor (contém apenas AdA) (AdA)	ESI 7

Tabela 4 - Constituição e composição das membranas seletivas

	Membranas						
	ESI 1	ESI 2	ESI 3	ESI 4	ESI 5	ESI 6	ESI 7
MIP	5,10%	3,60%	-	6,30%	5,20%	-	-
NIP	-	-	0,80%	-	-	5,30%	-
AdA	-	0,40%	-	-	0,90%	-	0,50%
ONPoE	63,80%	66,30%	63,80%	63,40%	65%	67,20%	66%
PVC	31,10%	29,80%	31,70%	32,10%	31,60%	32%	33,50%

A fase inicial da construção dos suportes condutores passou inicialmente pela preparação da estrutura de suporte à membrana sensora. A construção de cada suporte passou pela utilização de uma seringa na qual foi colocado um fio elétrico condutor, que foi fixado à extremidade superior do corpo do eletrodo através da aplicação de uma mistura 10:4 (g/g) Araldite A/endurecedor HR juntamente com grafite em pó. Na extremidade livre do fio elétrico condutor foi adaptado a um terminal através do qual foi possível estabelecer o contacto elétrico com o decimilivoltímetro.

As soluções de membranas foram depositadas, gota-a-gota, nos suportes condutores (eletrodos).

O processo de construção dos eletrodos encontra-se representado na figura seguinte.

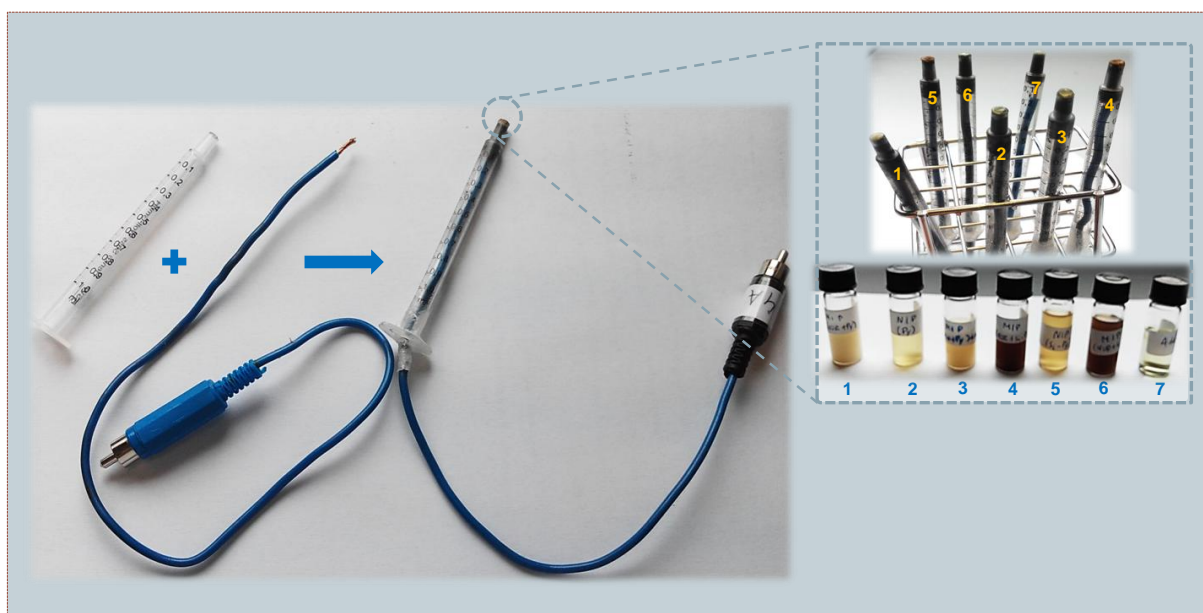


Figura 10 - Processo de construção dos eletrodos seletivos

2.6. Avaliação do desempenho dos eletrodos

As características gerais de funcionamento dos eletrodos foram avaliadas através da realização de várias curvas de calibração, em diferentes meios (PBS, HEPES e MES). As leituras potenciométricas foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação constante. Entre cada procedimento de calibração, os ESI foram condicionados em água ultra pura.

As curvas de calibração associadas às mesmas condições experimentais foram realizadas em duplicado, ou em triplicado sempre que o segundo duplicado não se mostrou coerente com o primeiro.

Os resultados obtidos foram avaliados com base no programa de computador Microsoft Excel 2010. Os parâmetros a ter em conta para posterior avaliação foram o LIRL, LD e o declive.

2.7. Análise de amostras

Foi efetuada a análise de amostras de água de uma mina do concelho da Maia, para a qual traçaram-se previamente curvas de calibração.

Para a determinação de NOR em água de mina diluiu-se 5 mL de amostra em 45 mL de 1×10^{-4} M do tampão HEPES pH=5,7. A concentração de NOR foi calculada usando o gráfico da curva de calibração. Através da equação de regressão linear da curva de calibração foi possível fazer corresponder o potencial da solução problema à quantidade de ião principal presente.

A precisão dos resultados foi determinada por intermédio do desvio padrão correspondente.

3. Resultados e discussão

Neste capítulo serão abordados a ligação do antibiótico NOR durante a preparação do sensor e a avaliação do seu desempenho, quando comparado com elétrodos compostos por diferentes membranas. A análise da superfície das partículas modificadas, a morfologia das membranas de PVC, assim como a sua análise de desempenho numa amostra real de água de mina também serão avaliadas.

3.1. Caracterização do material sensor

3.1.1. FTIR

A partir da análise dos espectros apresentados na figura 11 é possível evidenciar as diferenças existentes entre os traçados dos MIPs e dos NIPs, assim como as diferenças destes materiais sensores com as amostras designadas como brancos, isto é, a NOR e as nanopartículas de sílica aminada.

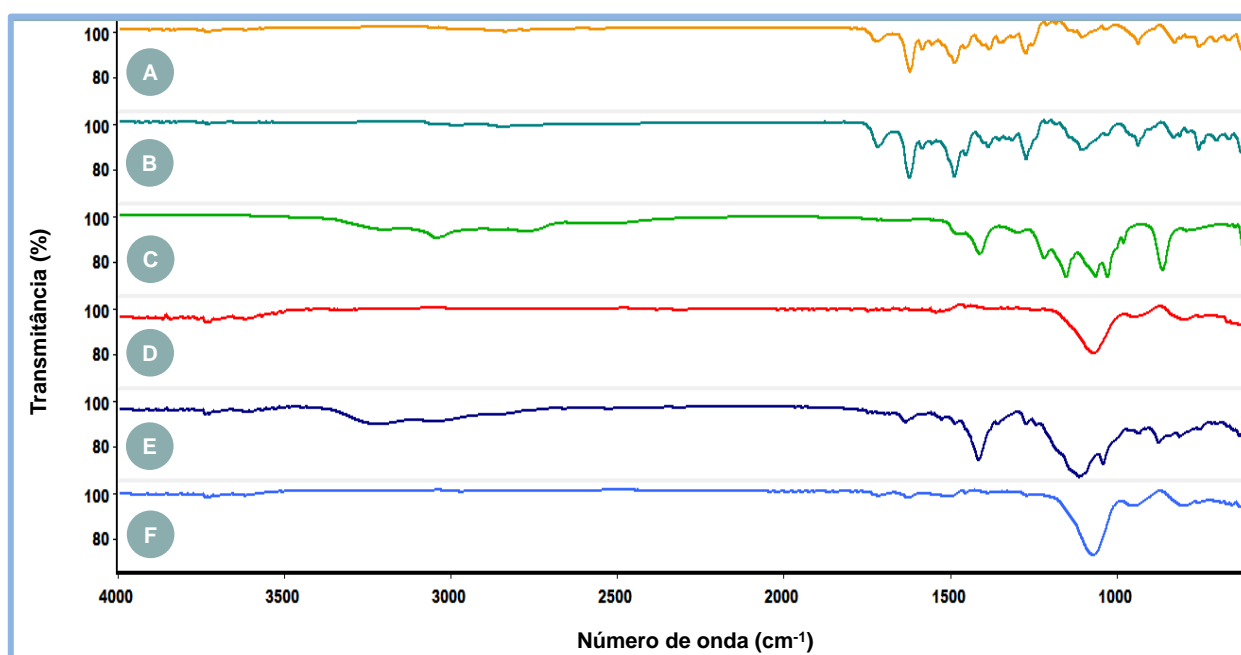


Figura 11 - Espectros de FTIR/ATR representativos dos materiais: (A) NOR, (B) MPy, (C) NPy, (D) nanopartículas de sílica aminada, (E) MSiPy e (F) NSiPy.

De acordo com a figura anteriormente apresentada pode-se observar que o espectro de FTIR da NOR (A) demonstra picos característicos, não muito evidenciados, entre os 3600 e 3500 cm^{-1} , que poderão corresponder ao alongamento vibracional do grupo OH e de uma ligação hidrogénio intermolecular através de uma ponte de hidrogénio [44]. A banda vibracional localizada entre 2750 e 2700 cm^{-1} e o pico a 1715 cm^{-1} podem indicar a presença

do grupo etilo e o estiramento do grupo carbonilo C=O, respetivamente. A presença do pico a 1620 cm^{-1} poderá ser atribuída à vibração de flexão N-H presente nas quinolonas (grupos de substâncias químicas antibacterianas) [44,45]. Ainda no presente espectro é possível observar-se picos a 1400 e 1500 cm^{-1} representativos das ligações O-C-O do grupo ácido, assim como, picos entre os 1250 e os 1350 cm^{-1} , que sugerem a vibração de flexão do grupo O-H e, conseqüentemente, a presença de um ácido carboxílico. Adicionalmente, também se verifica uma banda de absorção entre os 1100 e os 1000 cm^{-1} , que pode ser atribuída à presença do grupo C-F na composição da NOR, e um pico na região dos 950 e 900 cm^{-1} representativo da vibração de flexão NH dos grupos aminas [44].

Comparando o espectro de FTIR do MPy (B) com o espectro (A) pode-se verificar algumas semelhanças nos vários picos mencionados anteriormente, o que seria de esperar, uma vez que este material sensor teve, aquando a sua preparação, a presença da NOR, de modo a construir o molde da molécula. Contudo, neste espectro também se encontram outras bandas vibracionais que diferem do espectro (A), mas que contêm semelhanças com bandas presentes no espectro referente ao NPy (C) que poderão indicar a presença da estrutura do pirrol. Bandas localizadas entre os 3100 e 3000 cm^{-1} assinalam o estiramento dos grupos C-H constituintes do pirrol, a 1500 cm^{-1} a existência de vibrações do anel aromático do pirrol, a 1280 cm^{-1} uma deformação no plano da ligação C-N e, por fim, vibrações no plano das ligações C-H a 1150 , 1026 e 860 cm^{-1} [46,47]. Estas bandas são mais evidentes no espectro do NPy do que no MPy, uma vez que em (B) ocorreu a interferência adicional da NOR, que poderá ter promovido a modificação da estrutura do pirrol.

Analogamente a estes dois espectros, o traçado (E) e (F) apresentam semelhanças relativas à presença da estrutura do pirrol na sua constituição. Estas semelhanças comprovam-se com a existência de vibrações do anel aromático a 1500 cm^{-1} e com a deformação no plano das ligações C-N a 1280 cm^{-1} originárias da estrutura do pirrol [46,47]. Quanto às restantes bandas vibracionais características deste monómero não se encontram evidentes nestes espectros, devido à interação com as nanopartículas de sílica aminada que promoveram a sua modificação estrutural. Estas nanopartículas, representadas no espectro (D), revelam picos característicos a 1100 cm^{-1} e 950 cm^{-1} provenientes de ligações Si-O-Si e ligações Si-OH, respetivamente, e também se encontram evidentes nos espectros (E) e (F) [48]. Por fim, comparando o traçado (E) com o traçado (A) pode-se observar algumas similaridades, analogamente ao espectro (B), uma vez que apresentam picos característicos da presença de NOR, tais como os picos a 1400 e 1500 cm^{-1} .

3.1.2 Análise da superfície dos materiais sensores

A análise SEM foi utilizada de forma a permitir a caracterização da morfologia pormenorizada dos vários materiais sensores preparados.

A figura 12 demonstra as imagens de SEM representativas da morfologia da superfície dos materiais sensores, MPy e NPy, preparados com base no polímero condutor em estudo, o Py. De uma forma geral, a partir das imagens pode-se observar partículas dispersas (mais evidentes no caso do MPy) e aglomerados (no caso de algumas partículas da imagem do MPy, mas com maior evidência na imagem do NPy). Desta forma consta-se que durante a síntese deste material sensor não foi possível um controlo morfológico do tamanho e do crescimento das partículas. Na amostra MPy denota-se a existência de partículas de tamanhos distintos que variam entre os 10 e os 50 μm . No caso do NPy, em que se observam aglomerados, as partículas também diferem no seu tamanho, variando entre os 50 e os 200 μm .

Durante a análise de SEM, também foi realizada uma microanálise por raios X obtida a partir de uma análise de padrões de difração de elétrons retrodifundidos, como se pode ver nas imagens do MPy e do NPy que contêm indicadas as zonas, Z1 e Z2, e o gráfico respetivo de cada uma das microanálises por raios X adquiridas. No caso do MPy, através desta microanálise, é possível verificar a presença de alguns elementos químicos, tais como: carbono (C), azoto (N), oxigénio (O), fluor (F) e enxofre (S). Alguns destes elementos, como o C e O, exibem maior intensidade devido à presença de C em todos os compostos utilizados na preparação do MPy (NOR, Py, APS e TEMED) e devido à existência de O na composição da NOR e do APS. A presença do elemento de N deve-se, também ao facto de fazer parte da composição de todos os compostos utilizados na preparação do MPy, a existência do F pode ter surgido da NOR durante a construção do molde e, por fim, a existência do S, com intensidade muito fraca, pode ter sido originária do APS. Relativamente ao NPy verifica-se uma maior intensidade do elemento de O comparativamente ao C, o contrário do que acontece no MPy. Este facto pode ser explicado pela ausência de NOR na preparação do NPy, que faz com que a intensidade de C tenha diminuído e aumento de O devido à introdução de PBS, em substituição da NOR, na etapa da impressão da molécula. Assim sendo, a existência do S, proveniente do APS, ficou mais evidente ao apresentar maior intensidade e o N aumentou ligeiramente a sua intensidade comparativamente ao MPy, como é possível observar na figura 14 (A) (MPy representado com linha azul e o NPy com linha verde).

A figura 13 demonstra as imagens de SEM representativas da morfologia da superfície das nanopartículas de sílica aminada, do MSiPy e do NSiPy. De acordo com as imagens presentes pode-se observar que o tamanho das nanopartículas de sílica aminada varia entre

40 e 63 μm e que, analogamente ao que se observa na figura 12, as imagens do MSiPy e do NSiPy apresentam partículas dispersas e algumas partículas aglomeradas, sendo estas mais evidentes no MSiPy. O tamanho das partículas mencionadas varia entre 10 e 50 μm em ambos os materiais sensores, sendo que no MSiPy, estas podem apresentar tamanhos inferiores aos 10 μm , o que poderá ser explicado pelo processo que decorreu durante a polimerização que poderá ter originado a modificação do tamanho das partículas de sílica.

Relativamente às microanálises por raios X adquiridas nestas amostras é possível observar-se a presença de C, N, O, S e silício (Si). No caso das nanopartículas de sílica aminada regista-se a predominância de O, seguida de Si, C e, por fim, do N. Comparando esta amostra (figura 14 (B), representada com linha vermelha) com o MSiPy (figura 14 (B), representada com linha azul escuro), pode-se comprovar que a intensidade de O e de Si diminuíram de forma acentuada e, que a intensidade de C e S aumentou, o que pode ser explicado pela adição do polímero condutor (Py) e da NOR ao sistema, assim como o APS e o TEMED. Por fim, relativamente ao NSiPy pode-se observar (figura 14 (B), representada com linha azul claro) uma maior semelhança com as nanopartículas de sílica do que com o MSiPy, uma vez que neste material sensor não houve a influência da NOR durante o processo de polimerização e a intensidade dos elementos químicos se manteve próximo das demonstradas a partir das nanopartículas de sílica.

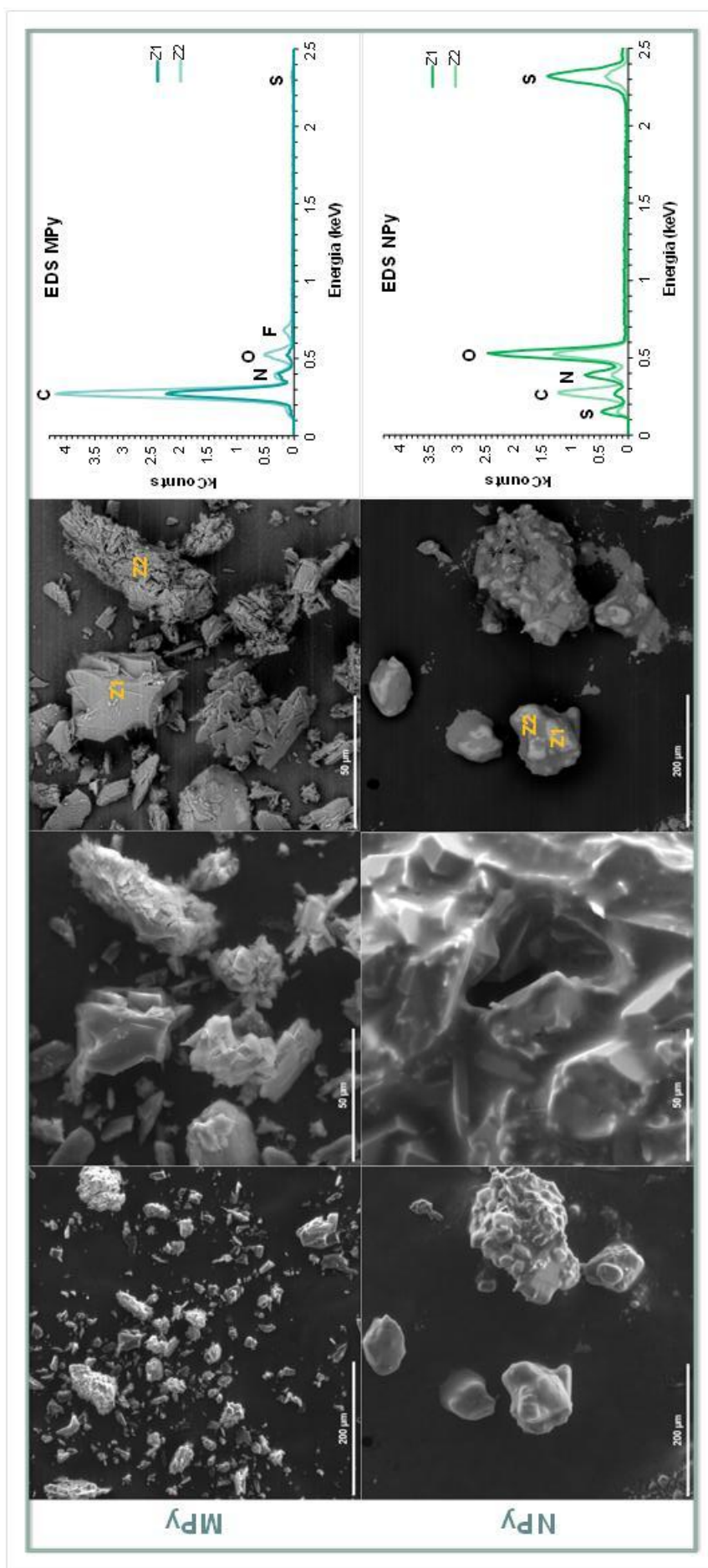


Figura 12 - Imagens de SEM representativas da morfologia da superfície dos materiais sensores: MPy e NPy.

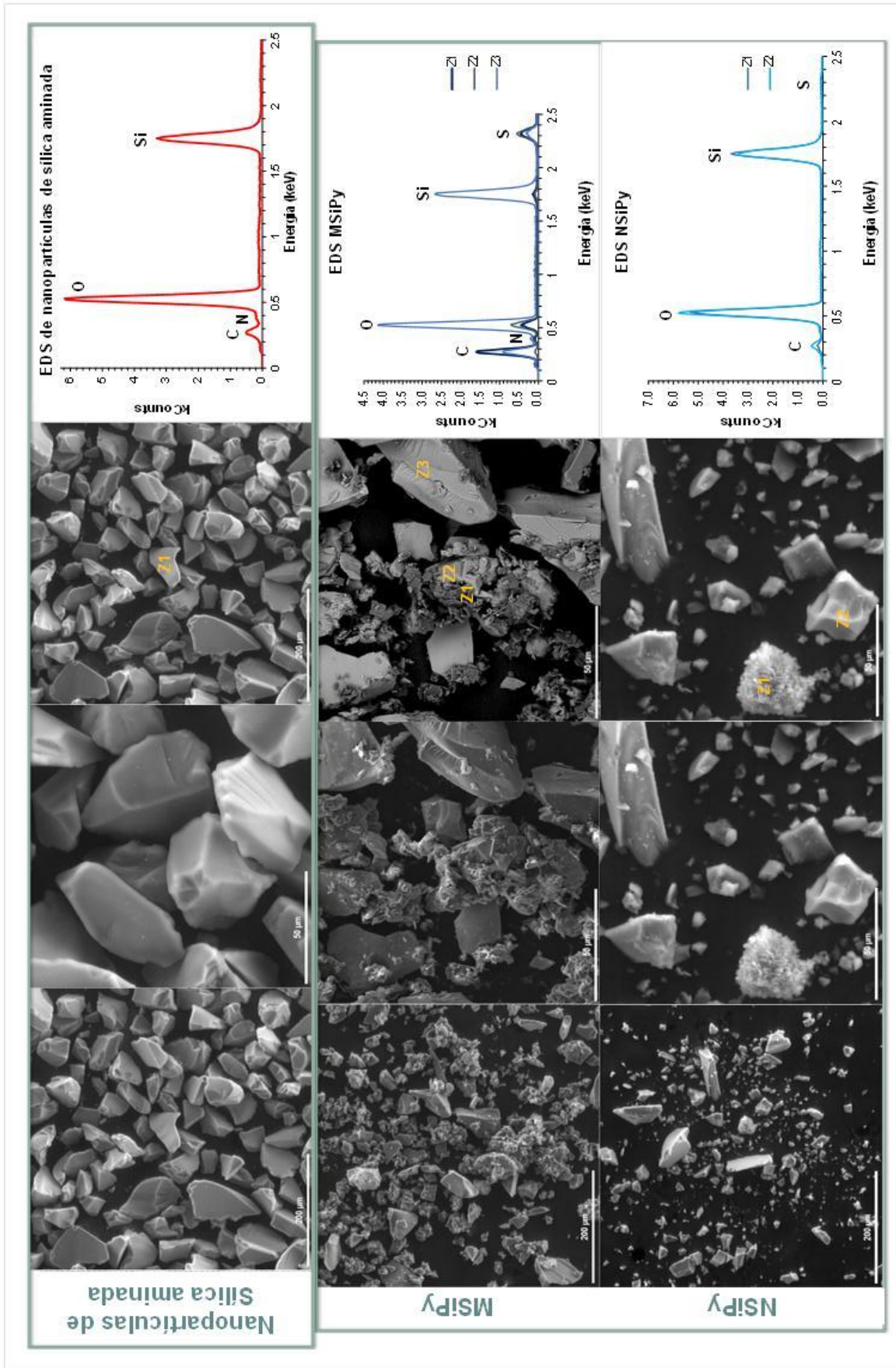


Figura 13 - Imagens de SEM representativas da morfologia da superfície das nanopartículas de sílica aminada e dos materiais sensores preparados a partir da sua modificação: MSiPy e NSiPy.

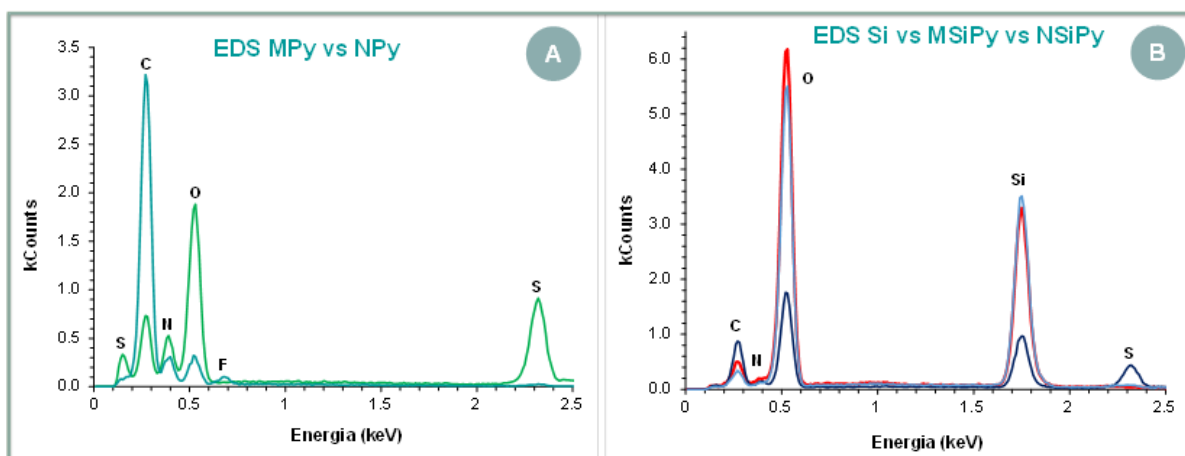


Figura 14 - Gráfico representativo da comparação da microanálise por raios X: (A) MPy vs NPy e (B) Si vs MSiPy vs NSiPy.

3.2. Desempenho dos sensores potenciométricos

Os sensores desenvolvidos para a molécula NOR foram preparados com compostos ativos na deteção potenciométrica (MPy, MPyAdA, NPy, MSiPy, MSiPyAdA, NSiPy e material de controlo AdA) dispersos num material plastificante com elevada constante dielétrica e PVC. A avaliação dos ensaios realizados para a determinação das suas principais propriedades analíticas decorreram de acordo com as recomendações da IUPAC, sendo estes sujeitos a estudos em diferentes tampões (PBS, MES e HEPES) e, posteriormente, numa amostra real (água de mina).

3.2.1. Desempenho dos sensores na deteção de NOR preparada em tampão PBS

3.2.1.1. Meio tampão PBS

As calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 foram realizadas para uma gama de concentrações entre $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, numa solução tampão $5,0 \times 10^{-2}$ M de PBS (pH 7,40), tal como demonstra a figura 15.

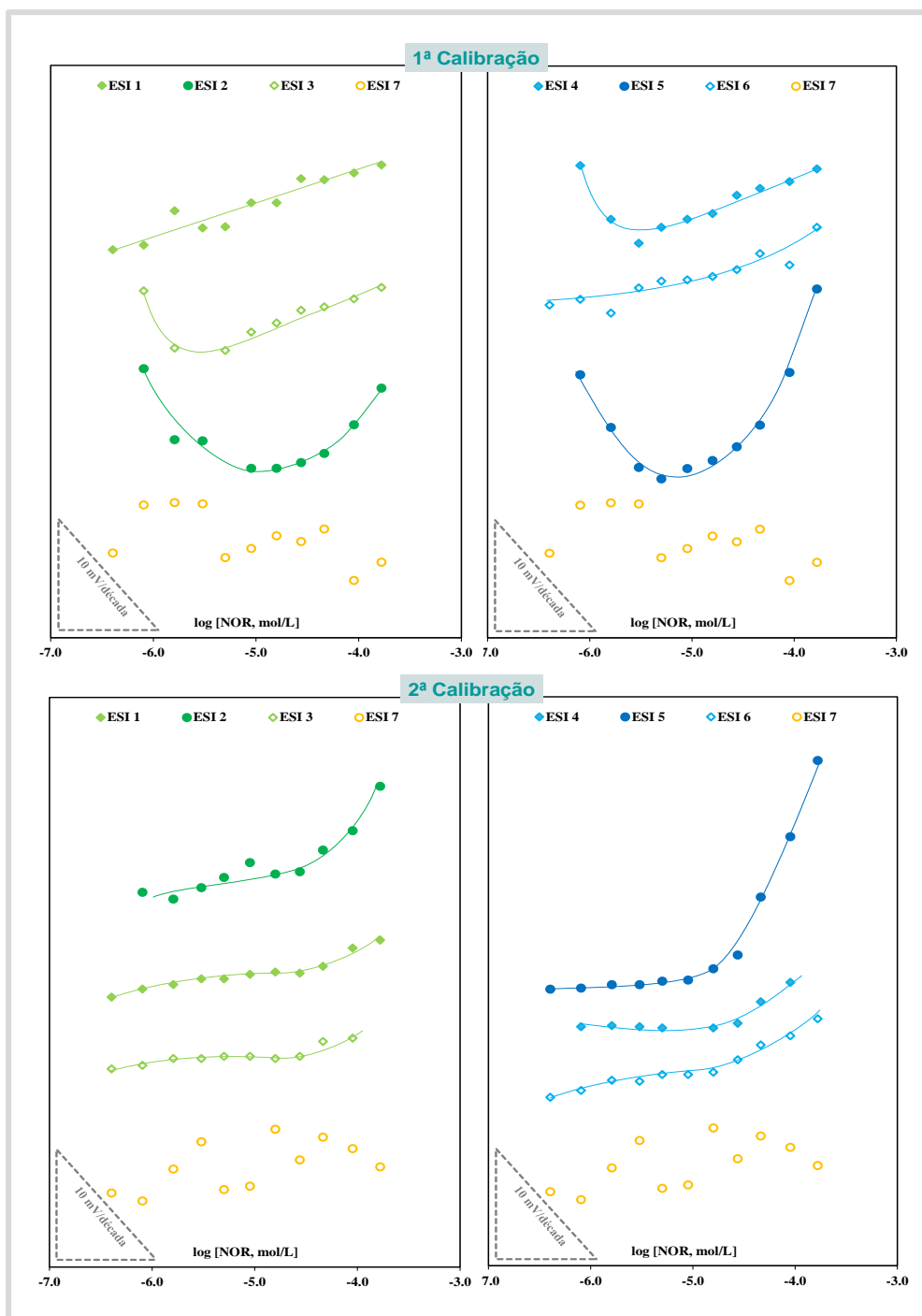


Figura 15 - Calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão PBS, pH de 7,40.

De uma forma geral, através dos valores presentes na figura 15, na 1ª e 2ª calibração, obteve-se a figura 16, representativa da média destes valores. Também se elaborou a tabela 5 que permite resumir as características potenciométricas em solução tampão PBS $5,0 \times 10^{-2}$ M de PBS (pH 7,40) para todos os ESI desenvolvidos.

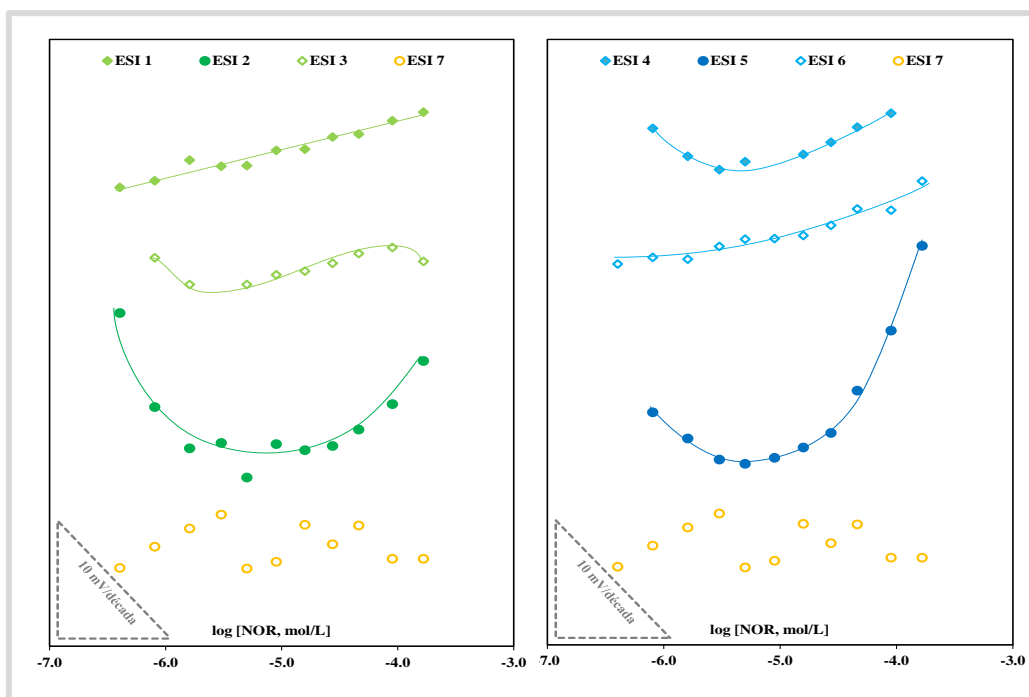


Figura 16 - Representação gráfica dos valores médios das calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão PBS, pH de 7,40.

Tabela 5 - Características potenciométricas em solução tampão PBS $5,0 \times 10^{-2}$ M, pH 7,40

Caraterísticas	ESI 1	ESI 2	ESI 3	ESI 4	ESI 5	ESI 6	ESI 7
Sensor	MPy	MPyAdA	NPy	MSiPy	MSiPyAdA	NSiPy	AdA
Declive (mV/década)	2,76	8,79	2,44	4,59	19,49	4,48	-
r^2	0,979	0,966	0,987	0,996	0,985	0,995	-
LD (mol/L)	$4,92 \times 10^{-6}$	$2,51 \times 10^{-5}$	$4,92 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-5}$	$2,51 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-5}$	-
LIRL (mol/L)	$4,92 \times 10^{-6}$	$2,69 \times 10^{-5}$	$4,92 \times 10^{-6}$	$1,56 \times 10^{-5}$	$2,69 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-5}$	-

O sensor MIP ESI 1 apresentou um comportamento linear a partir de $4,92 \times 10^{-6}$ mol/L de NOR, um declive de 2,76 mV/década e um limite de deteção de $4,92 \times 10^{-6}$ mol/L, enquanto que o MIP ESI 4 apresentou um comportamento linear a partir de $1,56 \times 10^{-5}$ mol/L de NOR, um declive de 4,59 mV/década e um limite de deteção de $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. O aditivo nestas calibrações não se revelou uma mais valia, não melhorando os declives nem os limites de deteção. Os declives obtidos nas calibrações neste meio tampão estão bastante abaixo dos

esperados teoricamente, verificando-se uma baixa sensibilidade de todos os elétrodos neste meio tampão.

3.2.1.2. Meio tampão MES

As calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 foram realizadas para uma gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, numa solução tampão $1,0 \times 10^{-4}$ M de MES (pH 4,50), tal como está demonstrado na figura 17.

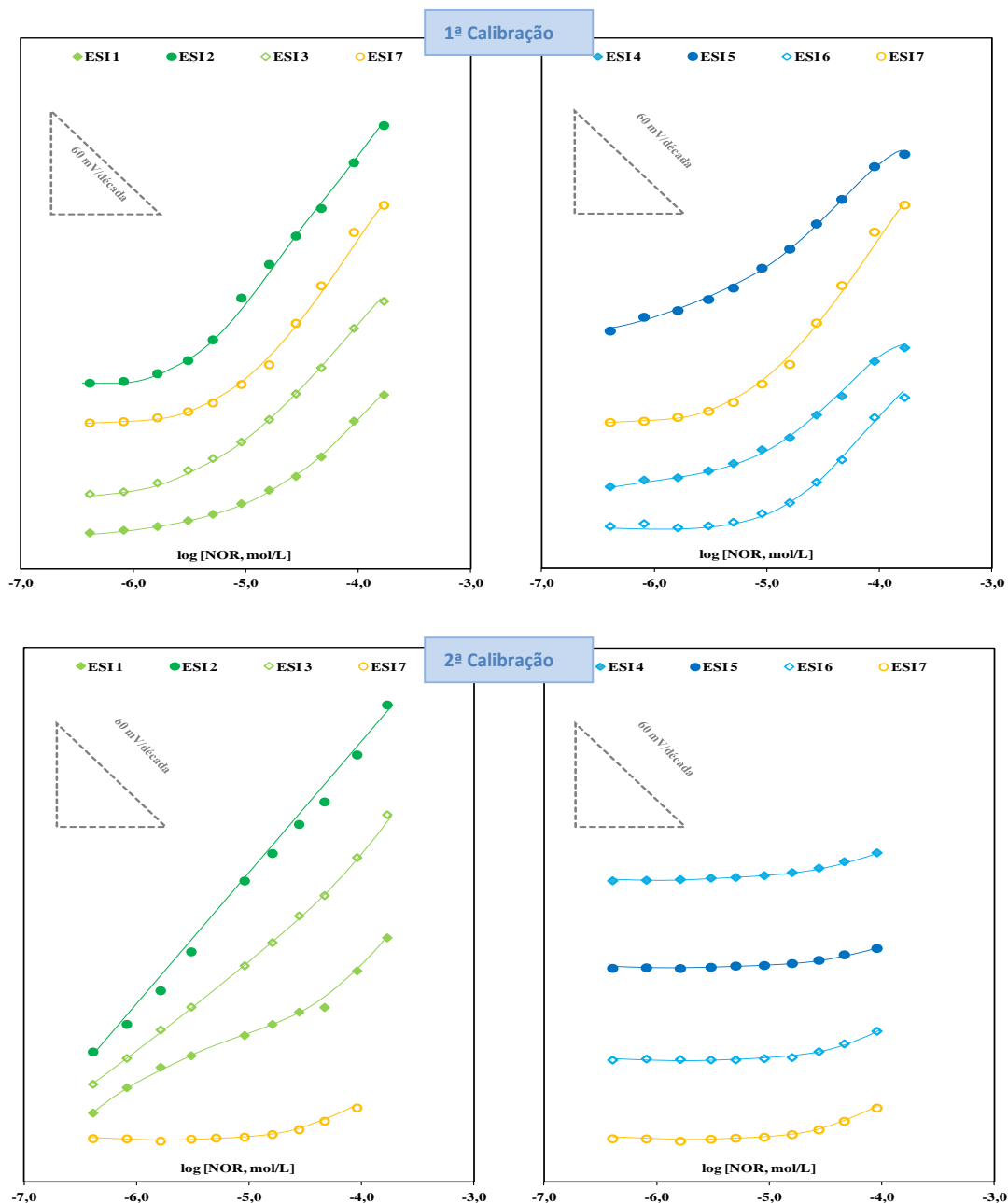


Figura 17 - Calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão MES, pH de 4,50.

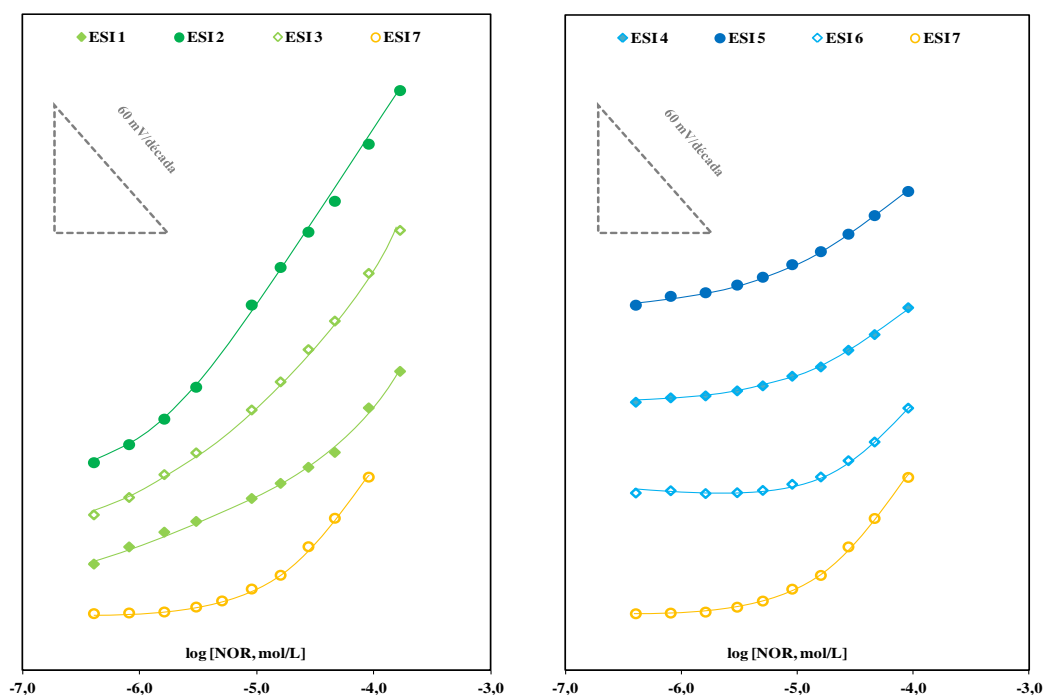


Figura 18 - Representação gráfica dos valores médios das calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão MES, pH de 4,50

Tabela 6 - Características potenciométricas em solução tampão MES $1,0 \times 10^{-4}$ M, pH 4,50.

Caraterísticas	ESI 1	ESI 2	ESI 3	ESI 4	ESI 5	ESI 6	ESI 7
Sensor	MPy	MPyAdA	NPy	MSiPy	MSiPyAdA	NSiPy	AdA
Declive (mV/década)	66,53	75,85	65,02	35,73	33,93	46,97	59,48
r^2	0,999	0,997	0,995	0,994	0,993	0,991	0,998
LD (mol/L)	$3,63 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-6}$	$7,08 \times 10^{-6}$	$1,26 \times 10^{-5}$	$6,76 \times 10^{-6}$	$2,24 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-5}$
LIRL (mol/L)	$4,53 \times 10^{-5}$	$2,96 \times 10^{-6}$	$8,82 \times 10^{-6}$	$1,56 \times 10^{-5}$	$8,82 \times 10^{-5}$	$2,69 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-5}$

A análise do declive das calibrações dos elétrodos demonstrou que os sensores baseados no monómero Py apresentaram uma sensibilidade bastante superior aos baseados em Py e sílica. O ESI 1 e o ESI 2 foram os elétrodos que apresentaram melhor desempenho com um declive de 66,53 e 75,85 mV/década, respetivamente. O limite de deteção foi de $3,63 \times 10^{-5}$ mol/L de NOR para o ESI 1 e de $2,00 \times 10^{-6}$ mol/L para o ESI 2. A presença do aditivo nos

elétrodos baseados no monómero Py revelou-se bastante proveitosa, melhorando a sensibilidade e baixando o limite de detecção de NOR.

3.2.1.3. Meio tampão HEPES

As calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 foram realizadas para uma gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, numa solução tampão $1,0 \times 10^{-4}$ M de HEPES (pH 5,70), tal como demonstra a figura 19.

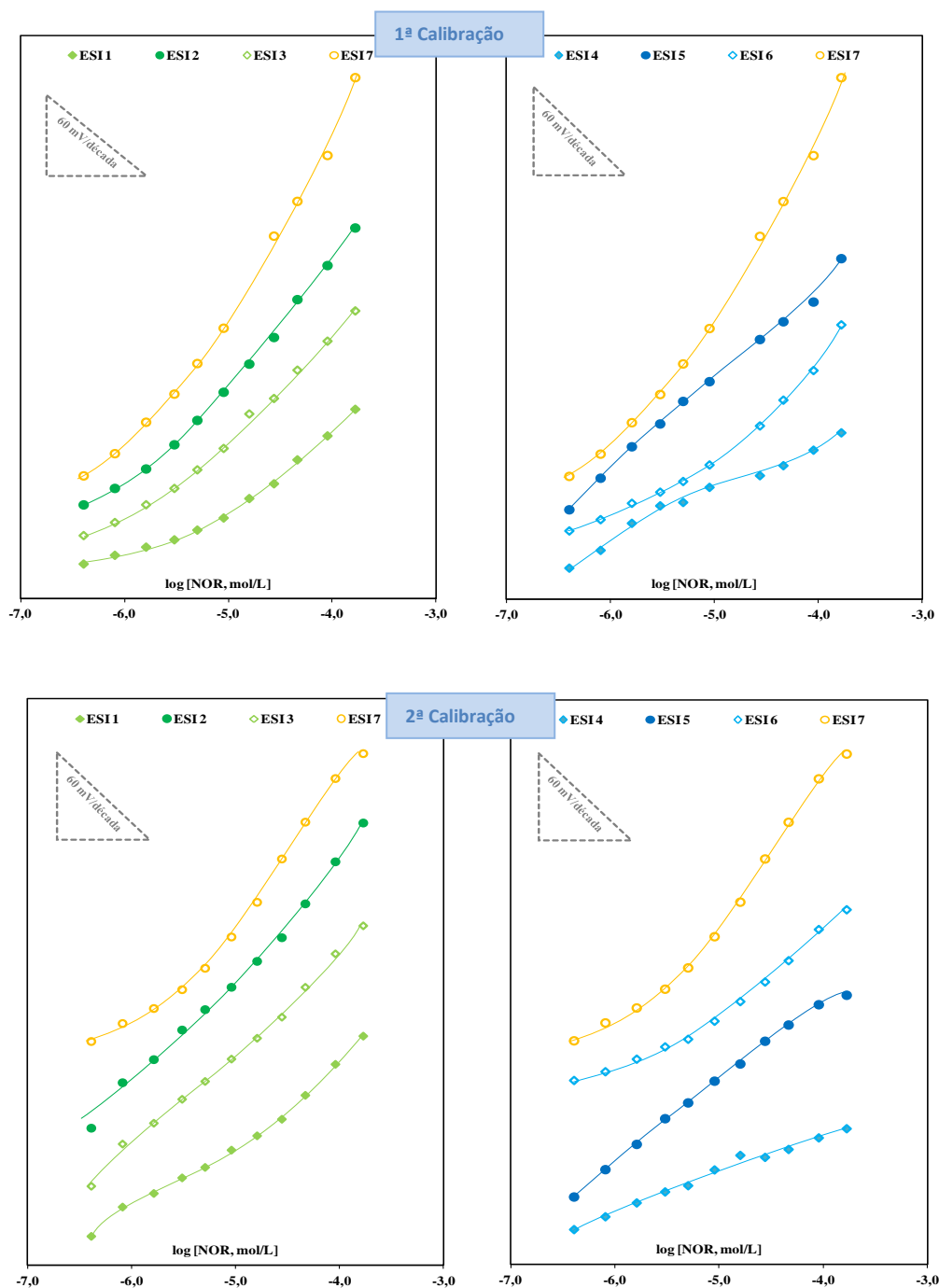


Figura 19 - Calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão HEPES, pH de 5,70.

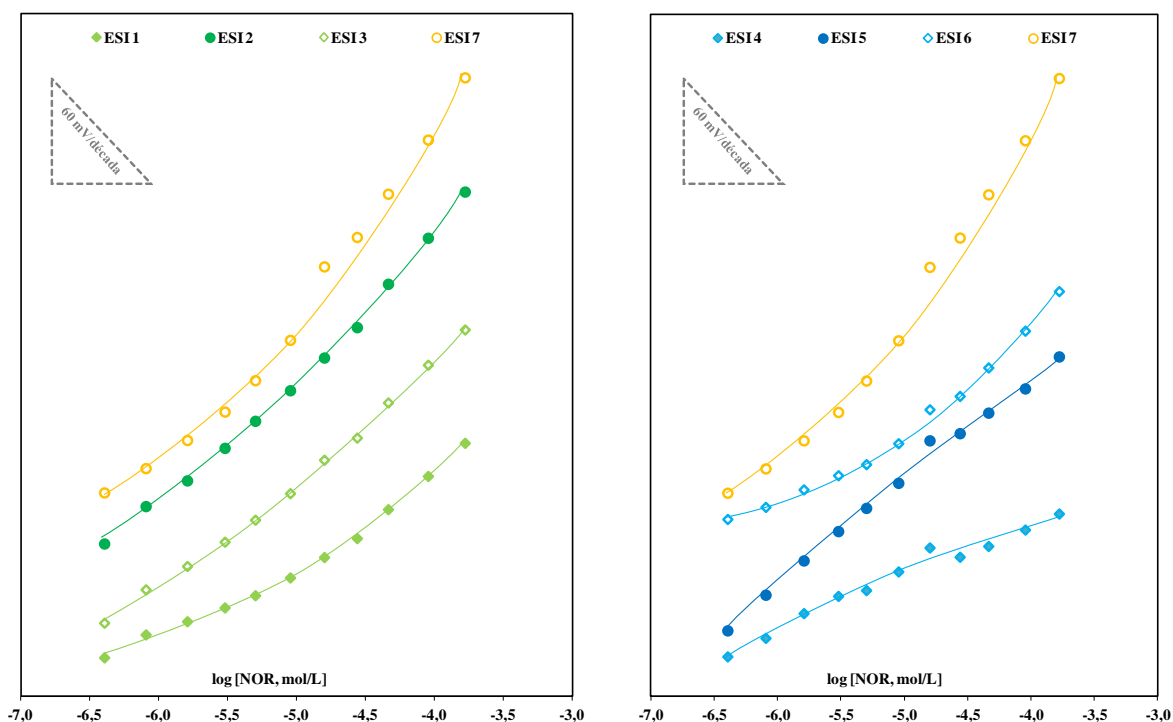


Figura 20 - Representação gráfica dos valores médios das calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão HEPES, pH de 5,70.

Tabela 7- Características potenciométricas em solução tampão HEPES $1,0 \times 10^{-4}$ M, pH 5,70

Caraterísticas	ESI 1	ESI 2	ESI 3	ESI 4	ESI 5	ESI 6	ESI 7
Sensor	MPy	MPyAdA	NPy	MSiPy	MSiPyAdA	NSiPy	AdA
Declive (mV/década)	62,89	86,71	72,18	35,52	61,42	68,32	112,11
r^2	0,992	0,995	0,997	0,998	0,992	0,989	0,996
LD (mol/L)	$8,82 \times 10^{-6}$	$1,58 \times 10^{-6}$	$1,58 \times 10^{-6}$	$2,69 \times 10^{-5}$	$3,95 \times 10^{-7}$	$6,61 \times 10^{-6}$	$2,17 \times 10^{-6}$
LIRL (mol/L)	$8,82 \times 10^{-6}$	$1,58 \times 10^{-6}$	$1,58 \times 10^{-6}$	$2,69 \times 10^{-5}$	$3,95 \times 10^{-7}$	$8,82 \times 10^{-6}$	$1,58 \times 10^{-6}$

Os elétrodos que apresentaram melhor desempenho nas calibrações em meio HEPES foram o ESI 1 e ESI 2 com declives de 62,89 e 86,71 mV/década, respetivamente. No que diz respeito a resposta linear e ao limite de deteção mais baixa, o ESI 5 foi o elétrodo que

apresentou melhor desempenho ao obter uma resposta linear a partir de $3,95 \times 10^{-7}$ mol/L de NOR e um limite de detecção de $3,95 \times 10^{-7}$ mol/L de NOR.

Como as calibrações feitas em meio tampão HEPES foram aquelas que apresentaram melhor desempenho dos elétrodos e de maneira a estudar também a influência dos íons presentes na solução de NOR preparada em meio PBS preparou-se a solução de NOR em HEPES e realizaram-se as calibrações na mesma gama de concentrações [$3,95 \times 10^{-7}$ - $1,63 \times 10^{-4}$] M de NOR, em tampão HEPES, pH de 5,70.

3.2.1. Desempenho dos sensores na detecção de NOR preparada em meio HEPES

3.2.1.1. Meio tampão HEPES

As calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 foram realizadas para uma gama de concentrações [$3,95 \times 10^{-7}$ - $1,63 \times 10^{-4}$] M de NOR, numa solução tampão $1,0 \times 10^{-4}$ M de HEPES (pH 5,70), tal como demonstra a figura 21.

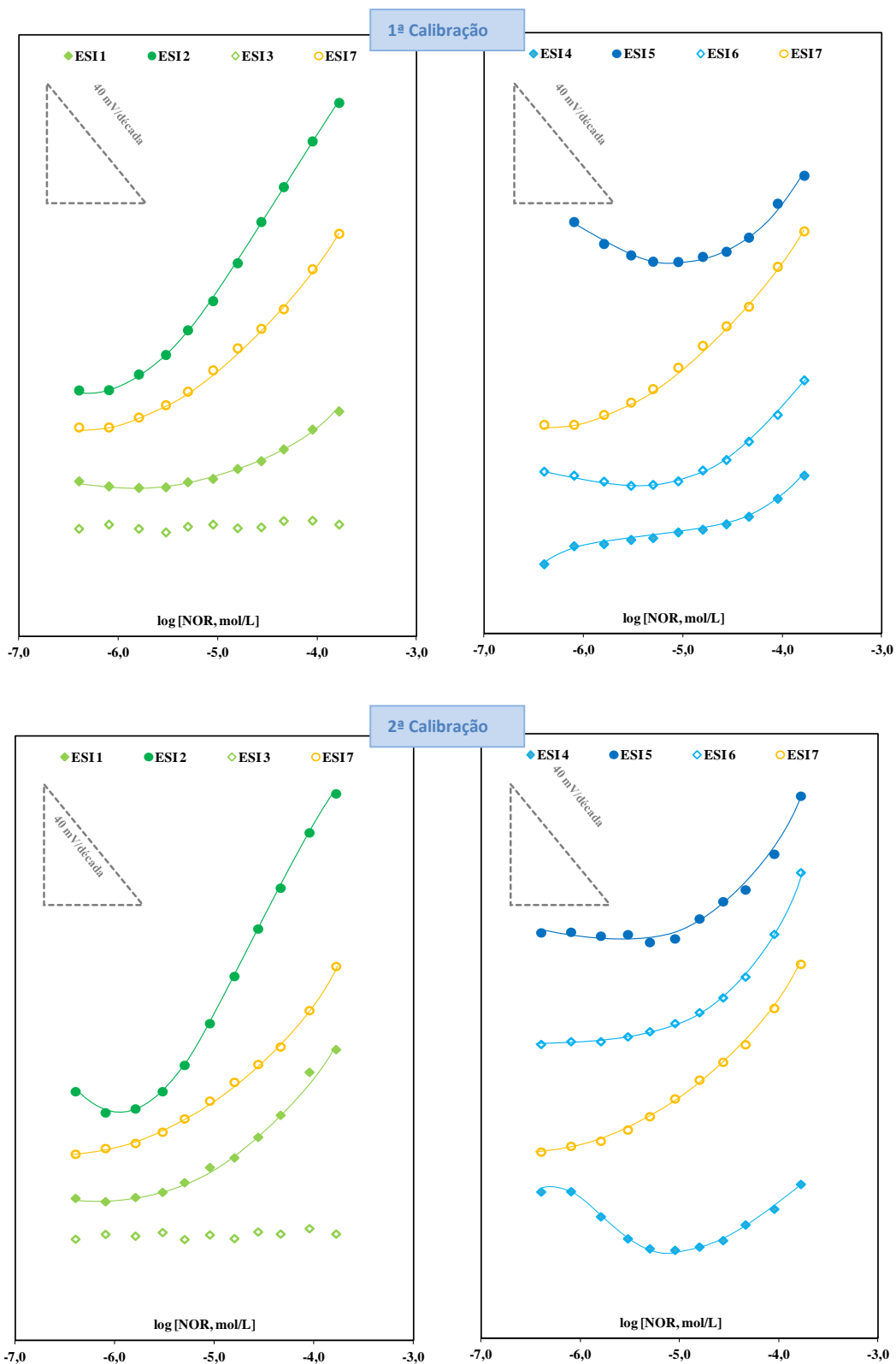


Figura 21 - Calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão HEPES, pH de 5,70.

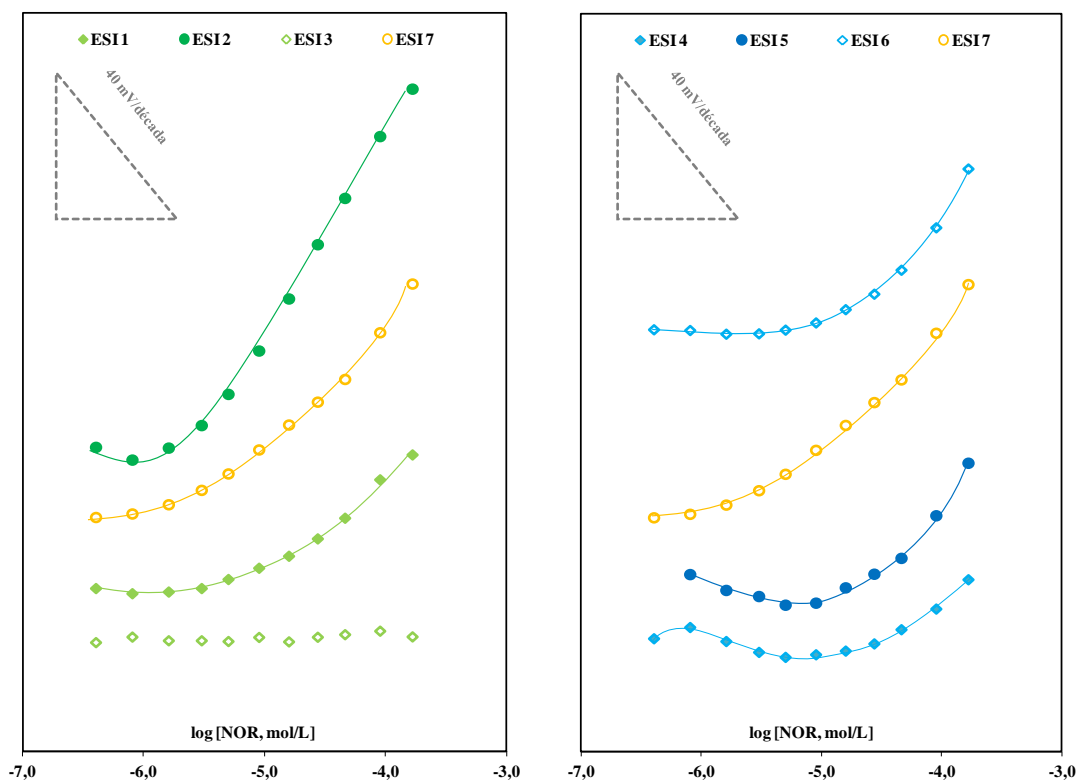


Figura 22 - Representação gráfica dos valores médios das calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3, ESI 4, ESI 5, ESI 6 e ESI 7 numa gama de concentrações $[3,95 \times 10^{-7} - 1,63 \times 10^{-4}]$ M de NOR, em tampão HEPES, pH de 5,70.

Tabela 8 - Características potenciométricas em solução tampão HEPES $1,0 \times 10^{-4}$ M, pH 5,70

Caraterísticas	ESI 1	ESI 2	ESI 3	ESI 4	ESI 5	ESI 6	ESI 7
Sensor	MPy	MPyAdA	NPY	MSiPy	MSiPyAdA	NSiPy	AdA
Declive (mV/década)	27,83	54,07	-	21,97	46,20	49,12	46,34
r^2	0,991	0,997	-	0,983	0,993	0,987	0,999
LD (mol/L)	$1,56 \times 10^{-5}$	$2,82 \times 10^{-6}$	-	$2,51 \times 10^{-5}$	$4,47 \times 10^{-5}$	$3,98 \times 10^{-5}$	$3,55 \times 10^{-5}$
LIRL (mol/L)	$1,56 \times 10^{-5}$	$2,96 \times 10^{-6}$	-	$2,69 \times 10^{-5}$	$4,53 \times 10^{-5}$	$4,53 \times 10^{-5}$	$4,53 \times 10^{-5}$

O elétrodo que apresentou melhor declive foi o ESI 2 com um declive com 54,07 mV/década, apresentando uma boa sensibilidade. Este também foi o elétrodo que apresentou um limite de deteção mais baixo ($2,82 \times 10^{-6}$ mol/L de NOR) e apresentou uma

resposta linear a partir de $2,96 \times 10^{-6}$ mol/L de NOR. A utilização do aditivo melhorou significativamente o desempenho dos elétrodos.

Em comparação com os resultados obtidos nas calibrações em meio HEPES da solução de NOR preparada em tampão PBS, pode-se verificar que as espécies iônicas presentes no PBS estavam a influenciar os resultados.

3.3. Seletividade em água dopada

A análise de seletividade dos sensores é das características mais importantes no que diz respeito à sua aplicação analítica.

No sentido de proceder à análise da seletividade foram realizadas curvas de calibração em água de mina dopada diluída em solução tampão HEPES, nesta análise foram utilizados os elétrodos ESI 1 e o ESI 2 dado que ao longo das diversas calibrações foram os elétrodos que apresentaram melhor desempenho, assim como os seus controlos ESI 3 e ESI 7.

Na figura 23 encontram-se representadas as calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3 e ESI 7 em água de mina dopada diluída em HEPES.

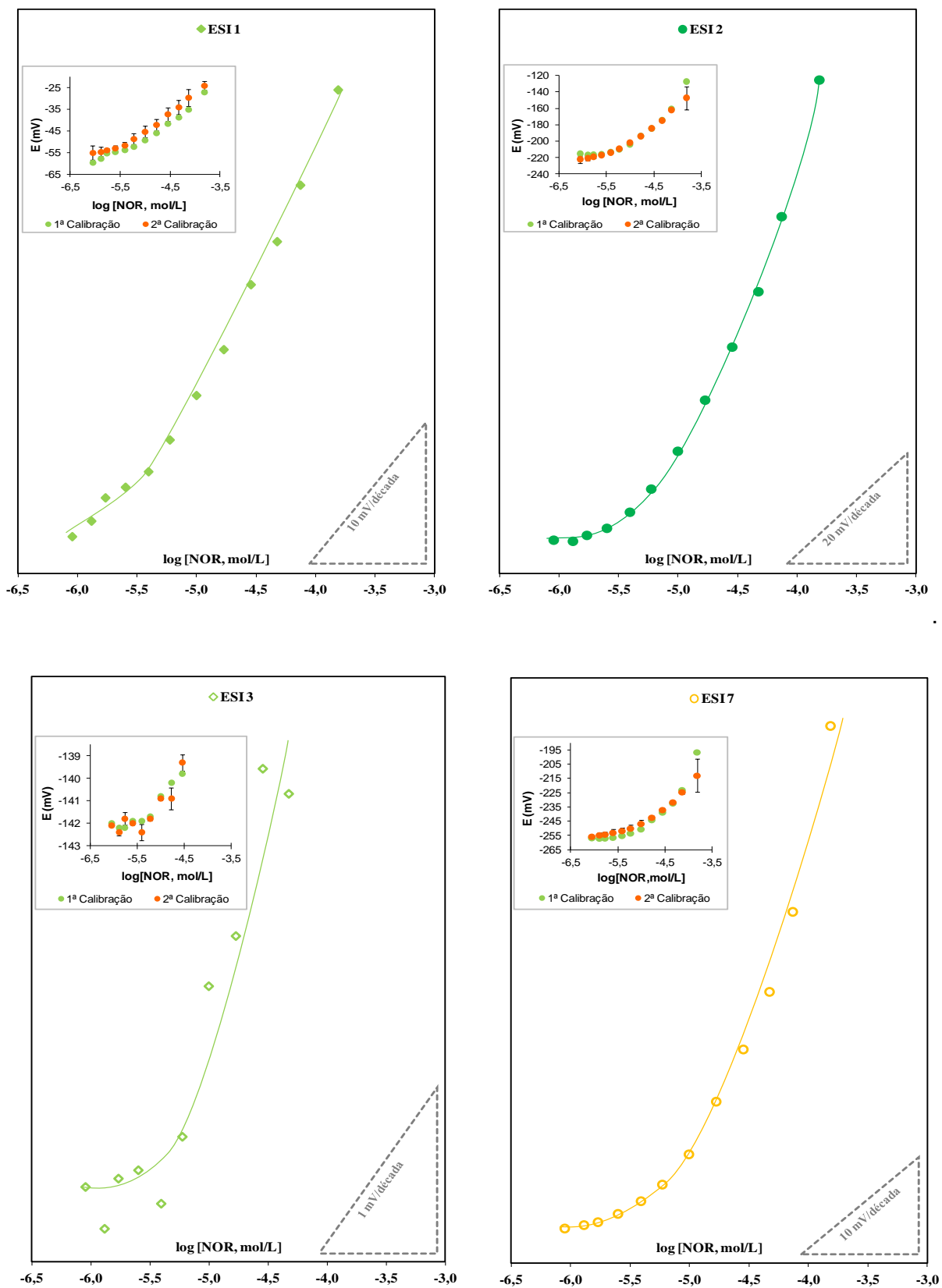


Figura 23 - Gráficos representativos da média das calibrações dos elétrodos ESI 1, ESI 2, ESI 3 e ESI 7 em água de mina dopada diluída em HEPES com indicação das respectivas barras de erro

O elétrodo que apresentou melhor declive foi o ESI 2 com 43,43 mV/década, seguido do ESI 4 com um declive de 26,93 mV/década, do ESI 1 com 16,47 mV/década e do ESI 3 com 3,11 mV/década. Os erros associados a estas calibrações variaram entre os 3 e 16 % para o ESI 1, os 0,5 e 16% para o ESI 2, os 0,1 e 3% para o ESI 3 e os 0,3 e 8% para o ESI 7.

3.3.1. Aplicação Analítica

Os níveis de concentração de NOR escolhidos não foram definidos de acordo com os valores esperados NOR devido a não ter sido possível encontrar um valor de *cut-off* para a água utilizada na aquacultura.

Os elétrodos utilizados (ESI 1, ESI 2, ESI 3 e ESI 7) foram os mesmos do parâmetro estudado anteriormente. O registo das calibrações obtidas encontram-se representadas nas figuras seguintes.

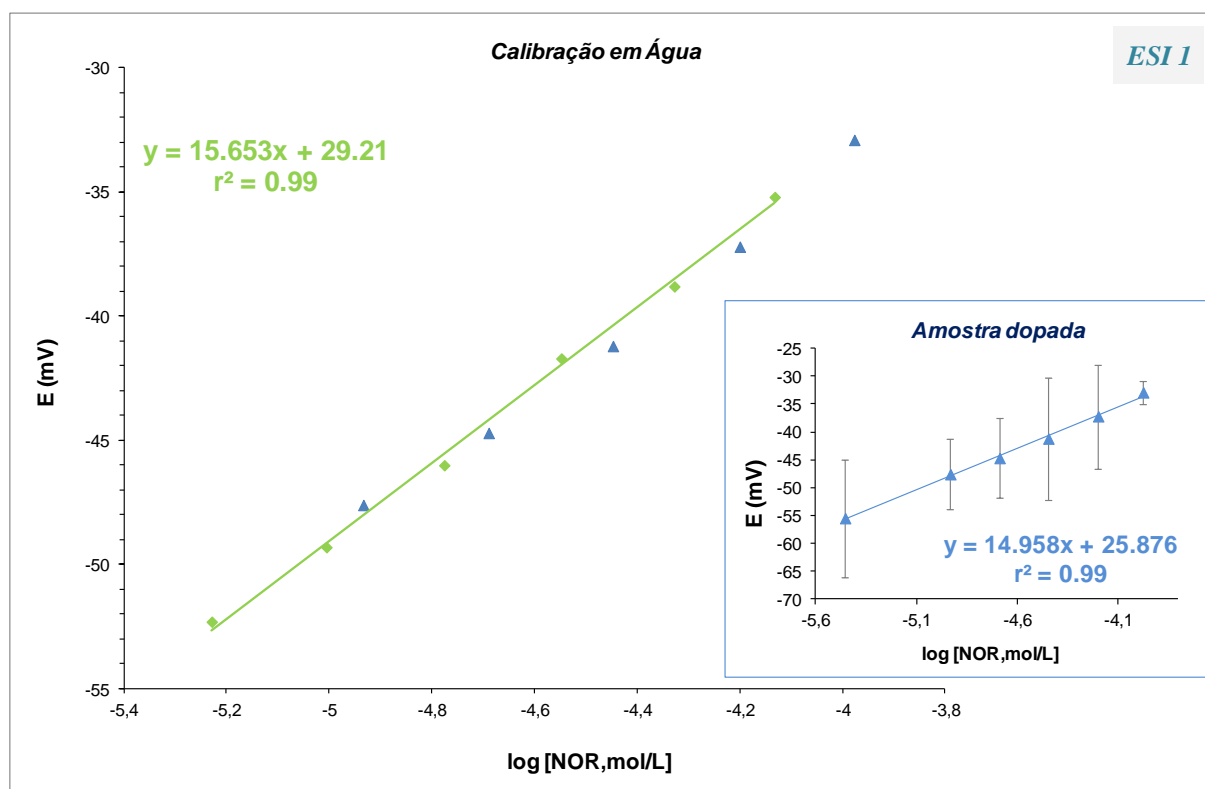


Figura 24 – Calibração do ESI 1 em água dopada e aplicação numa amostra de água dopada

Através da figura 24, referente ao ESI 1, pode-se verificar um declive de 15,65 mV/década, com um LD de $3,91 \times 10^{-6}$ mol/L e um coeficiente de correlação de 0,99. Os valores de potencial correspondentes à análise da amostra de água dopada com NOR também se encontra na mesma figura apresentando uma resposta linear relativa a esta região de concentrações, correspondendo com um declive de 14,96 mV/década e um coeficiente de correlação de 0,99. Os erros associados a esta análise variaram entre os 2 e os 11%.

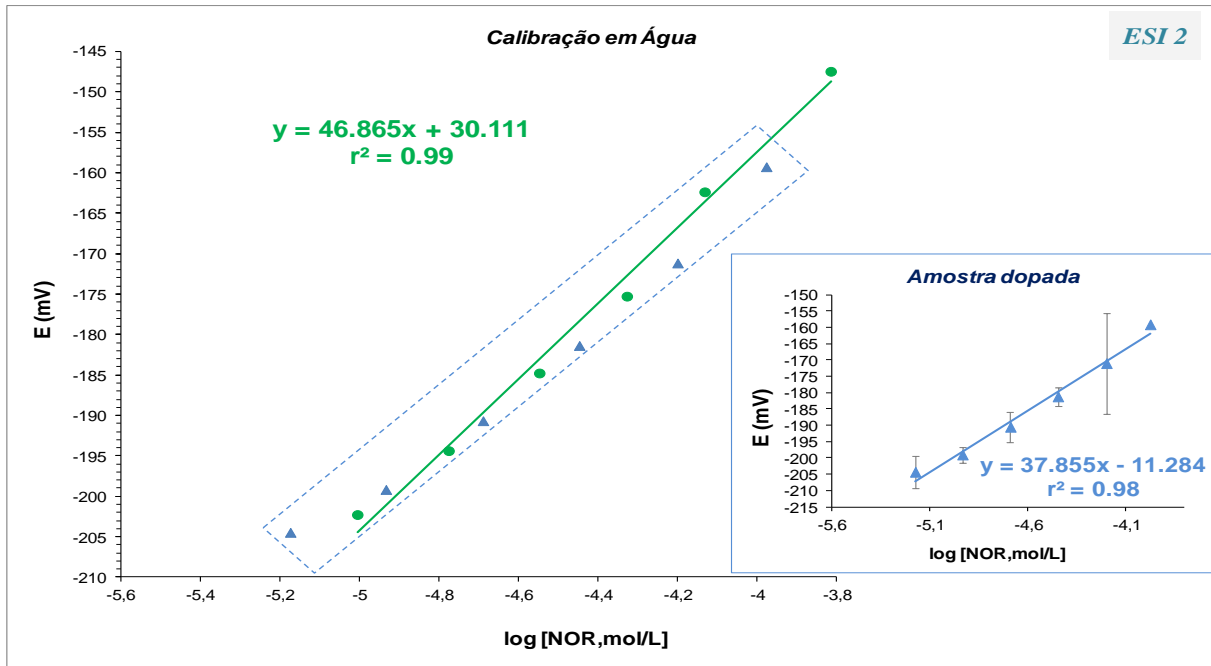


Figura 25 - Calibração do ESI 2 em água dopada e aplicação numa amostra de água dopada

A figura 25, representativa do ESI 2, demonstra um declive de 46,87 mV/década, com um LD de $3,91 \times 10^{-6}$ mol/L e um coeficiente de correlação de 0,99. Os valores de potencial correspondentes à análise da amostra de água dopada com NOR também se encontra na mesma figura apresentando uma resposta linear relativa a esta região de concentrações, correspondendo com um declive de 37,86 mV/década, um coeficiente de correlação de 0,98 e com valores de erros associados entre os 2 e os 15%.

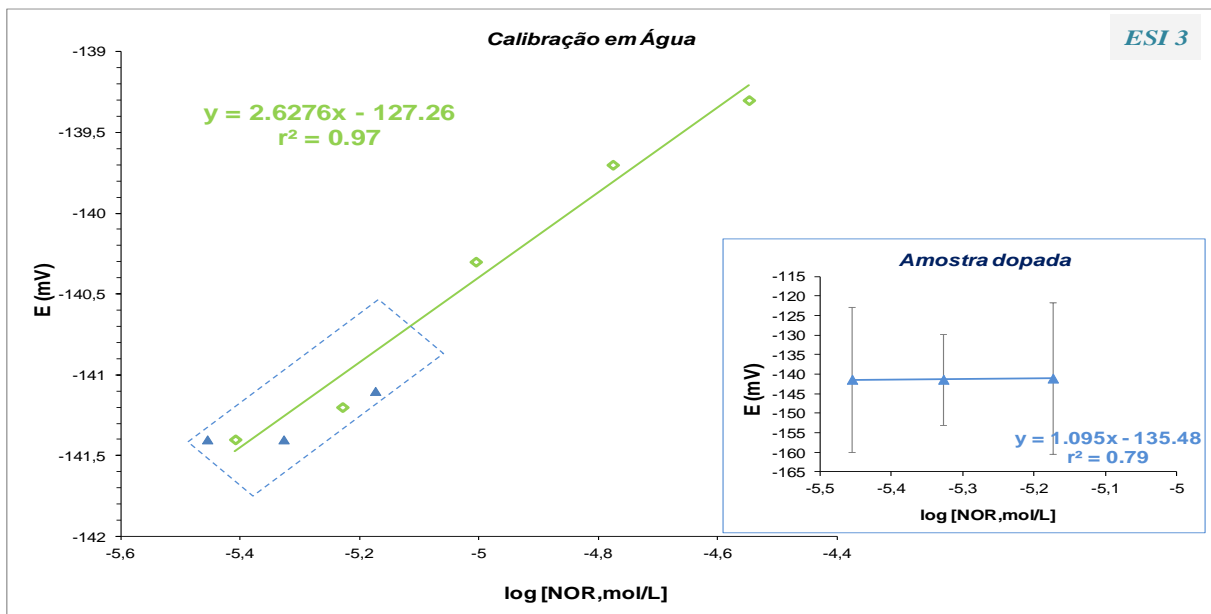


Figura 26 - Calibração do ESI 3 em água dopada e aplicação numa amostra de água dopada

De acordo com a figura anterior é possível verificar que para o ESI 3 obteve-se um declive de 2,63 mV/década, um LD de $5,91 \times 10^{-6}$ mol/L e um coeficiente de correlação de 0,97. A análise da amostra de água dopada com NOR demonstrou uma resposta não linear relativa a esta região de concentrações, apresentando valores de erro superiores a 12%.

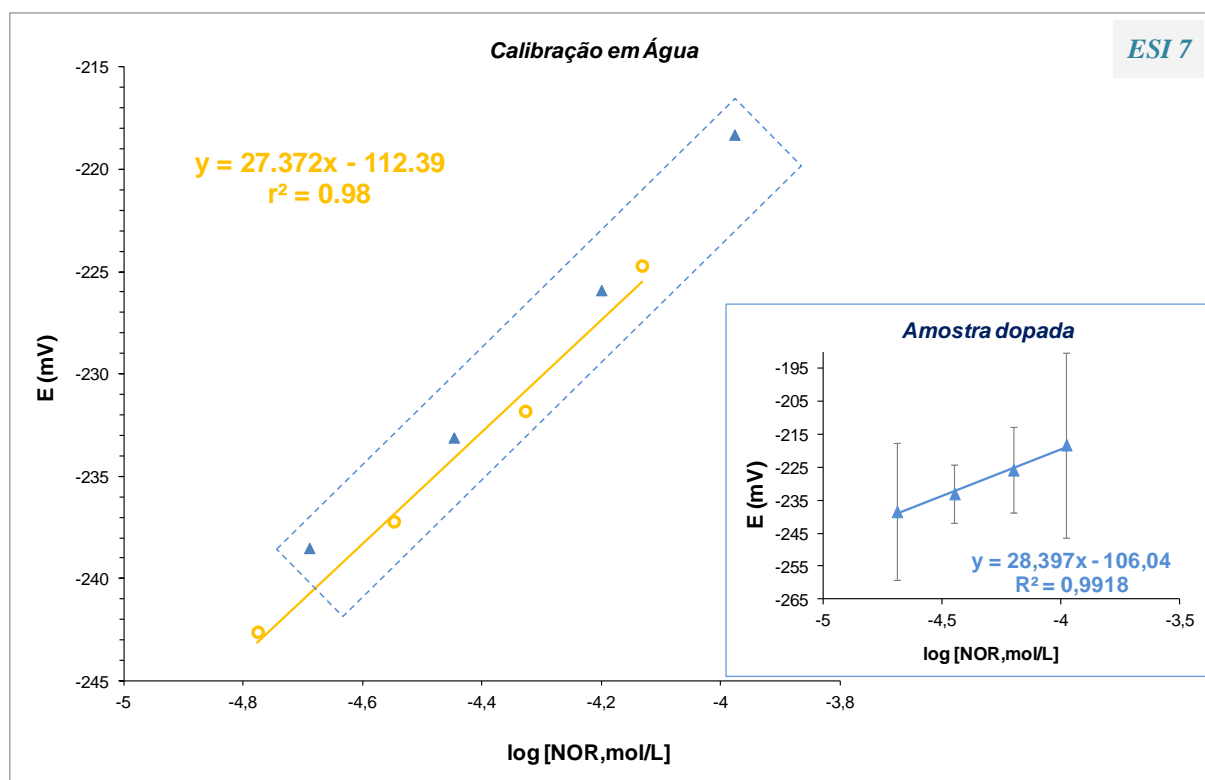


Figura 27 – Calibração do ESI 7 em água dopada e aplicação numa amostra de água dopada

Pela análise da figura 27, referente ao ESI 7, observou-se um declive de 27,37 mV/década, com um LD de $5,91 \times 10^{-6}$ mol/L e um coeficiente de correlação de 0,98. Os valores de potencial correspondentes à análise da amostra de água dopada com NOR, também representada na mesma figura, apresentou uma resposta linear relativa a esta região de concentrações, correspondendo com um declive de 28,40 mV/década e um coeficiente de correlação de 0,99. Os erros associados a esta análise variaram entre os 9 e os 28%.

4. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

A interação entre o antibiótico NOR e os materiais biomiméticos foi de extrema importância, uma vez que permitiu uma resposta potenciométrica linear nos materiais com locais de ligação impressos dimensionados para a interação. De acordo com os resultados apresentados, é possível concluir que o material sensor aplicado no ESI 2, que contém com um aditivo aniônico na sua composição, foi o dispositivo que permitiu obter melhores propriedades de resposta, comparativamente com restantes dispositivos em estudo.

De uma forma geral, a metodologia de conceção dos sensores revelou-se simples, com baixo tempo de resposta, baixo limite de deteção e a boa sensibilidade para a deteção da NOR. Com a escolha de uma membrana adequada, o método proposto é simples, sensível, de baixo custo e alternativo aos métodos analíticos já existentes para a deteção do NOR. No entanto, como em todos os trabalhos, é importante considerar que este biosensor poderia ser alvo de algumas melhorias através de um maior estudo de possíveis interferentes, assim como um possível alargamento da gama de concentrações em estudo.

A aplicação prática deste dispositivo também poderia considerada num contexto clínico, sendo necessário realizar análises com amostras reais de urina, incluindo amostras de indivíduos saudáveis e doentes.

5. Referências bibliográficas

- [1] Governo de Portugal, 2015. Plano Estratégico para a Aquicultura Portuguesa 2014-2020. Portugal.
- [2] FAO F. The state of world fisheries and aquaculture. Rome; 2012. 209
- [3] Smith, Peter R; 2008; . Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In L. B. J. and H. K. Luca Guardabassi, editores. Guide to antimicrobial use in animals. Blackwell;. 207– 18
- [4]. Leston S, Nunes M, Lemos MFL, Jorge G, Pardal MÂ, Ramos F. 2011. The veterinary drug use and environmental. In: Borgearo RS, editor. Animal Feed: Types, nutrition and safety. Nova Science Publishers, Inc.;. 61–83
- [5] Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (UN), 2014, <http://www.fao.org/fishery/en>, on-line, (Acedido a 24 de outubro de 2014)
- [6] R.J. Goldberg, M.S.Elliott, R.L.Naylor; 2001. Marine Aquaculture in the United States, environmental impacts and policy options. Pew Oceans Commission, Arlington, Virginia.
- [7]. S. Gastalho , G.J. da Silva , F. Ramos; 2014 Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública; Acta Farmacêutica Portuguesa, vol. 3, n. 1, pp. 29-45
- [8] Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ; 2009; Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. Clinical infectious diseases: an official publication of the Inf Dis. Soc. Am. 49(8):1248–53)
- [9] C.H.G. Daughton, T.A. Ternes, 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. Environmental Health Perspectives, 107 (6): 907-938.
- [10] W.Gau, J Kurz, U.Petersen, H.Ploschke, C.Wuensche, 1986. Isolation and structural elucidation of urinary metabolites of ciprofloxacin. Drug Residues, 36 (10): 1545-1549.
- [11] S.A. Brown, 1996. Fluoroquinolones in animal health. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 19 (1): 1-14.
- [12] B.Suh, B.Lorber, 1995. Quinolones. Medical Clinics of North America, 79(4): 869-894.
- [13] Y.Picó, V.Andreu, 2007. Fluoroquinolones in soil-risks and challenges. Analytical. Bioanalytical. Chemistry, 387 (4): 1287-1299.

- [14] J.Beausse, 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends Analytical Chemistry*, 23 (10-11): 753-761.
- [15] K.G.Karthikeyan, M.T.Meyer, 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin. *Science of the Total Environment*, 361 (1-3): 196-207.
- [16] M.S.Díaz-Cruz, M.J.Lopez de Alda, D. Barceló, 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Analytical Chemistry*, 22 (6): 340-351.
- [17] E.Turiel, A.Martín-Esteban, J.L.Tadeo, 2007. Molecularly imprinted polymeric fibers for solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 79 (8): 3099–3104.
- [18] A.C.Hueta, C.Charliera, G.Singhb, S.Benrejeb Godefroyb, J.Leivoc, M.Vehniäinenc, M.W.F.Nielend, S.Weigel, 2008. Development of an optical surface plasmon resonance biosensor assay for (fluoro)quinolones in egg, fish, and poultry meat. *Analytica Chimica acta*, 623 (2): 195–203.
- [19] C.W.Jeon , M.A.Khan , S.H.Lee, M.M.Karim , H.K.Lee , Y.S.Suh , S.M.Alam, H.Y.Chung, 2008. Optical flow-through sensor for the determination of Norfloxacin based on emission of $\text{KMnO}_4, \text{Na}_2\text{SO}_3\text{--Tb}^{3+}$ system. *Journal Fluorescence*, 18 (5): 843-851.
- [20] A.L.Kadurugamuwa, L.V.Sin, J.Yu, K.P.Francis, T.F.Purchio, P.R.Contag, 2004. Non invasive optical imaging method to evaluate postantibiotic effects on biofilm infection in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (6): 2283-2287.
- [21] H.Sirén, 2002. Environmental water monitoring by capillary electrophoresis and result comparison with solvent chemistry techniques. *Journal of Chromatography A*, 957 (1): 17-26.
- [22] E.A.Pereira, 2004. Indirect determination of chloride and sulfate ions in alcohol fuel by capillary electrophoresis. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 380 (1): 178-182.
- [23] C.S.Chang, W.H.Wang, C.E.Tsai, 2008. Simultaneous determination of eleven quinolones qntibacterial residues in marine products and animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(6): 87-96.
- [24] L.Haixia, X.Wu1, Z.Xie, X.Lin, L.Guo, C.Yan, G. Chen, 2001. Separation and determination of seven fluoroquinolones by pressurized capillary electrochromatography. *Journal of Separation Science*, 28 (16): 2210-2217.

- [25] Vieira, C, 2014 Desenvolvimento de anticorpos plásticos para um biomarcador de cancro. Dissertação de Mestrado – Instituto Superior de Engenharia do Porto. Porto.
- [26] Queirós, R. B, 2013. Biosensors for the detection and quantification of aquatic bacterial contamination in waters for human use. Tese de Doutoramento - Departamento de Física e Astronomia da Faculdade de Ciências Universidade do Porto. Porto.
- [27] Moreira, F.,2014. Determinação de Norfloxacin em aquacultura. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Universidade do Porto. Porto, 2009.
- [28] Ganjali, M. R.; Faridbod, F.; Saboury, A. A.; Davarkhah, N.; Divsalar, A.; Behbehani, G. R.; Norouzi, P.;2009 A New Approach for Protein Binding Isotherm Analysis by Means of an Electrochemical Microsensor, International Journal of Electrochemical Science, Iran.
- [29] Buck, R. P.; Lindner, E.,1994 Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes. International Union of Pure and Applied Chemistry, 1994, vol. 66, p. 2527 - 2536.
- [30] Burnett, R. W.; Covington, A. K.; Fogh-Andersen, N., et al. 2000. Use of Ion-Selective Electrodes for Blood-Electrolyte Analysis. Recommendations for Nomenclature, Definitions and Conventions. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine ., 363 – 370.
- [31] Umezawa, Y.; Umezawa, K; Sato, H.,1995 Selectivity coefficients for ion-selective electrodes: recommended methods for reporting $K_{A,B}^{pot}$ values. International union of pure and applied chemistry, vol. 67, p. 507 - 518.
- [32] L. Ye, J.K. Mosbach, 2001. The technique of molecular imprinting principle, state of the art, and future Aspects, Inc. Phenom. Macro., 41 (1-4) 107-113
- [33] Hillberg, A. L.; Tabrizian, M.,2008 Biomolecule imprinting: Developments in mimicking dynamic natural recognition systems, Elsevier Masson, Canadá.
- [34] Moreira, F. T. C.; Dutra, R. A. F.; Noronha, J. P. C.; Cunha, A. L.; Sales, M. G. F.;2011. Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces, Biosensors and Bioelectronics, Porto, Portugal.
- [35] Gai, Q.; Liu, Q.; Li, W.; He, X.; Chen, L.; Zhang, Y. 2008. Preparation of bovine hemoglobina-imprinted polymer beads via the photograftingsurface-modified method. Higher Education Press and Springer-Verlag, Front. Chem. China, 2008, vol. 3, p. 370-377.

- [36] Tan, C. J.; Chua, H. G.; Ker, K. H.; Tong, Y. W.; 2008. Preparation of Bovine Serum Albumin Surface-Imprinted Submicrometer Particles with Magnetic Susceptibility through Core-Shell Miniemulsion Polymerization, National University of Singapore, Singapore.
- [37] Li, L.; He, X.; Chen, L.; Zhang, Y.; 2009. Preparation of novel bovine hemoglobin surface-imprinted polystyrene nanoparticles with magnetic susceptibility, Science and China Press, China.
- [38] Puoci, F.; Cirillo, G.; Curcio, M. et. al; Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) in Biomedical Applications, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Calabria, Italy.
- [39] Reddy, S. M.; Sette, G.; Phan, Q.; Electrochemical Probing of Selective Hemoglobin Binding in Hydrogel-based Molecularly Imprinted Polymers..., Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guilford, Surrey, UK.
- [40] Opik, A.; Menaker, A.; Reut, J.; Syritski, V.; 2009 Molecularly imprinted polymers: a new approach to the preparation of functional materials, Department of Materials Science, Tallinn University of Technology, Estonia,
- [41] Guerreiro, J. R. L.; Sales, M. G. F.; Moreira, F. T. C.; Rebelo, T. S. R; 2010 Selective recognition in potentiometric transduction of amoxicillin by molecularly imprinted materials, Springer-Verlag,.
- [42] Tarley, C.; Sotomayor M. e Kubota, L., 2005. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de mip (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação; Quim. Nova, Vol. 28, No. 6, 1076-1086.
- [43] Silva, T., 2010. Desenvolvimento de um sensor óptico para determinação de Norfloxacin. Dissertação de Mestrado – Instituto Superior de Engenharia do Porto. Porto, 2010.
- [44] Sahoo S, Chakraborti CK, Behera PK, Mishra SC , 2012 . FTIR and Raman Spectroscopic Investigations of a Norfloxacin/Carbopol934 Polymeric Suspension. Journal of Young Pharmacists Vol 4, No 3 (DOI: 10.4103/0975-1483.100017).
- [45] Sadeek A. Sadeek, Walaa H. El-Shwiniy, Wael A. Zordok, Akram M. El-Didamony ; 2009. Synthesis, spectroscopic, thermal and biological activity investigation of new Y(III) and Pd(II) norfloxacin complexes. The Journal of the Argentine Chemical Society, 97(2):128-148.

- [46] Ms. Sci. Xuediao Cai, 2005. Synthesis and Characterization of Pyrrole Based Adhesion Promoter Systems on Oxide Substrates. Dissertação para atribuição do grau de Doutor Rerum Naturalium na Faculdade de Ciências Matemáticas e Naturais da Universidade de Tecnologia de Dresden.
- [47] Amol J. Patil, Arti K. Pandey , 2012. A novel approach for *in situ* polymerization of polypyrrole on cotton substrate. Indian journal of Fibre Textile Research, 37:107-113.
- [48] Herman Mansur, Rodrigo Oréfice, Marivalda Pereira, Zélia Lobato, Wander Vasconcelos, Lucas Machado, 2002 .FTIR and UV-vis study of chemically engineered biomaterial surfaces for protein immobilization. Spectroscopy, 16:351–360. IOS Press