



Desenvolvimento de um Sensor Eletroquímico para o Trimetoprim em Amostras Ambientais

ANA BEATRIZ PEREIRA DA SILVA

novembro de 2022

Mestrado em engenharia Química

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química

Desenvolvimento de um Sensor Eletroquímico para o Trimetoprim em Águas

Autor: Ana Beatriz Pereira da Silva

Orientadora: Professora Simone Morais – REQUIMTE-LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto

Co-orientador: Doutor Álvaro Torrinha – REQUIMTE-LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto

PORTO

OUTUBRO DE 2022

Este estudo foi suportado pelo projeto CECs(Bio)Sensing (PTDC/ASP-PES/29547/2017) é cofinanciado pelo Programa Operacional da Competitividade e Internacionalização (POCI -01-0145-FEDER- 029547) e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia na sua componente OE. A componente da Universidade Federal do Ceará (Brasil) é financiada pela FUNCAP (ref^a FCT-00141-00011.01.00/18).

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer ao GRAQ- Grupo de Reação e Análises Químicas por me ter dado a oportunidade de ter realizado esta dissertação.

Gostaria de agradecer a todos aqueles que me apoiaram e de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Um enorme obrigada ao meu coorientador Doutor Álvaro Torrinha, pela compreensão acompanhamento e orientação durante este percurso. Agradeço também à minha orientadora Professora Simone Morais pela disponibilidade, interesse e por ter confiado em mim para levar a cabo este trabalho.

Por fim, não posso deixar de agradecer aos meus pais por todo o apoio, às minhas irmãs pelas palavras de confiança que me transmitiram e que me ajudaram a enfrentar este projeto. Um especial agradecimento a todos aqueles que me apoiaram, amigos e colegas de trabalho, pela ajuda e paciência.

O meu sincero obrigada a todos que fizeram parte desta fase crucial da minha carreira académica.

Resumo

O trimetoprim (TMP) é um fármaco antibacteriano sintético cujo consumo crescente tem levado à sua presença em ambientes aquáticos sendo, assim, detetado frequentemente em massas de água e em espécies aquáticas. A sua presença no meio ambiente pode causar consequências nos ecossistemas podendo provocar efeitos negativos nos mesmos.

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um sensor eletroquímico de papel fibra de carbono (CP) não modificado para a deteção do TMP.

Inicialmente foram realizados ensaios com diferentes técnicas eletroquímicas de forma a avaliar qual delas apresenta uma melhor resposta à presença do fármaco. As técnicas eletroquímicas utilizadas foram a voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Avaliou-se, também, numa fase inicial, vários pré-tratamentos a conferir ao elétrodo sem modificação de forma a garantir o máximo sinal analítico, nomeadamente pré-tratamentos eletroquímicos baseados em CV e amperometria a diferentes potenciais fixos num eletrólito básico ou ácido. Verificou-se, contudo, que o CP sem qualquer pré-tratamento obteve uma boa resposta eletroquímica ao TMP comparado com o CP pré-tratado sendo assim usado para o desenvolvimento do sensor. A técnica selecionada foi a SWV (de acordo com o melhor sinal obtido) tendo-se em seguida otimizado as condições analíticas, nomeadamente o pH da solução, os parâmetros da técnica (amplitude, frequência e degrau de potencial) e a deposição de analito (potencial de deposição e tempo de deposição). Obteve-se um valor de pH ótimo igual 7 e, para os parâmetros de SWV, uma amplitude ótima de 0,02 V, uma frequência de 50 Hz e um degrau de potencial de 0,015 V. O tempo e potencial de deposição que maximizam o sinal foram de 60 s e 0,7 V, respetivamente. Aplicando os parâmetros ótimos, foram feitos ensaios de linearidade numa gama de concentrações entre 0,1 μM e 80 μM de TMP, tendo-se atingido a saturação após os 40 μM . A curva de calibração foi dividida em duas zonas lineares. Com base na primeira zona de linearidade (concentrações entre 0,1 μM e 1 μM) obteve-se um limite de deteção igual a $0,16 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ($n=3$) e um limite de quantificação igual a $0,47 \pm 0,09 \mu\text{M}$, sendo bastante competitivo em relação a elétrodos mais tradicionais nanoestruturados como o de carbono vítreo e o de pasta de carbono.

Por fim, o sensor CP demonstrou capacidade para ser aplicado na determinação de TMP em amostras ambientais (água de rio), obtendo-se uma recuperação de 89%

através do método de adição padrão, contudo sendo ainda necessário mais ensaios para obtenção de percentagens de recuperação próximas de 100%. Conclui-se que este tipo de sensor apresenta um grande potencial para ser aplicado na deteção de contaminantes em amostras ambientais.

Palavras-chave: sensor eletroquímico, trimetoprim, voltametria de onda quadrada, contaminantes emergentes

Abstract

Trimethoprim (TMP) is a synthetic antibacterial drug, whose increasing consumption has led to its presence in aquatic environments, thus being detected very frequently both in bodies of water and in aquatic species. Its presence in the environment can have consequences on ecosystems and may have negative effects on them.

The main goal of this work consisted in the development of an electrochemical sensor of unmodified carbon fiber paper (CP) for the detection of TMP.

Initially, tests were performed with different electrochemical techniques to determine which one was the most sensitive. The electrochemical techniques used were cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV). In an initial phase, several pre-treatments were applied to the electrode without modification to guarantee the maximum analytical signal, namely electrochemical pre-treatments based on CV and amperometry at different fixed potentials in a basic or acid electrolyte. However, it was found that the CP without any pre-treatment obtained the best electrochemical response to TMP, thus being used for the development of the sensor. The selected technique was SWV according to the best signal obtained, with the analytical conditions being then optimized, namely the pH of the solution, the parameters of the SWV technique (amplitude, frequency and step potential) and finally the analyte deposition (deposition potential and deposition time). An optimal pH value equal to 7 was obtained; regarding the SWV parameters, the optimal amplitude was 0.02 V, the frequency 50 Hz and the step potential 0.015 V. The optimal deposition time and potential were equal to 60 s and 0.7 V, respectively. Applying the optimized parameters, the linearity was assessed in the concentration range between 0.1 μM and 80 μM , reaching saturation after 40 μM . The calibration curve was divided into two linear zones. Based on the first linearity zone (concentrations between 0.1 μM and 1 μM), a detection limit equal to $0.155 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ($n=3$) was obtained and a quantification limit equal to $0.466 \pm 0.09 \mu\text{M}$, being quite competitive in relation to more traditional nanostructured electrodes such as glassy carbon and carbon paste.

Finally, the CP sensor demonstrated the ability to be applied in the determination of TMP in environmental samples (river water), with recuperation of 89%, however, more tests are still needed to obtain recovery percentages close to 100%. This type of sensor has great potential to be applied in the detection of contaminants in environmental samples.

Keywords: electrochemical sensor, trimethoprim, square wave voltammetry, emerging contaminants

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Contaminantes emergentes, produção e distribuição.....	1
1.1.1	Contaminantes emergentes	1
1.1.2	A presença de CEs no meio aquático	2
1.2	A importância dos produtos farmacêuticos na contaminação do meio ambiente 5	
1.2.1	Trimetoprim e sua ocorrência em ambiente aquático.....	5
1.3	Métodos analíticos para a deteção de contaminantes emergentes	8
1.4	Sensores eletroquímicos	9
1.4.1	Voltametria cíclica.....	9
1.4.2	Voltametria de pulso diferencial.....	11
1.4.3	Voltametria de onda quadrada.....	12
1.5	Eléctrodos	15
1.6	Sensores eletroquímicos para a determinação de Trimetoprim	16
2	Objetivos	21
3	Metodologia experimental.....	23
3.1	Equipamento experimental	23
3.2	Reagentes e soluções	23
3.3	Procedimento experimental	23
4	Resultados e discussão	25
4.1	Otimização do pré-tratamento a conferir ao CP	25
4.2	Otimização das condições analíticas e determinação de Trimetoprim.....	35
	Conclusões.....	47
	Bibliografia.....	49

Índice de figuras

Figura 1.1 Concentração (ng/l) de fármacos anti-inflamatórios não esteróides detetados em amostras de águas superficiais de diferentes países ^[2]	3
Figura 1.2 Fórmula química do TMP ^[8]	5
Figura 1.3 Origem da ocorrência de fármacos em ambiente aquático ^[6]	7
Figura 1.4 Voltamograma ciclico típico para o processo de oxidação-redução da espécie hexacianoferrato com representação do potencial de pico anódico (E _{pa}) e catódico (E _{pc}) e determinação da intensidade do pico anódico (i _{pa}) e catódico (i _{pc}) ^[6]	10
Figura 1.5 Aumento da tensão de base ao longo do tempo para voltametria diferencial de pulso ^[12]	11
Figura 1.6 Esquema de montagem de um circuito para medição DPV. 1)elétrodo de trabalho, 2) contra eletrodo, 3) eletrodo de referência ^[12]	12
Figura 1.7 Representação esquemática da voltametria de onda quadrada, onde: 1) potencial na forma de onda; 2) escala de potencial; 3) forma de aplicação do potencial na SWV; 4) forma da onda da corrente; 5) sinal da corrente; 6) corrente diferencial e 7) corrente total ^[13]	13
Figura 1.8 Voltogramas esquemáticos de onda quadrada ^[13]	14
Figura 4.1 Comparação por CV entre CP e CP pré-tratado com ácido sulfúrico por via eletroquímica para 50 μM TMP em PBS pH 4,5. Velocidade de varrimento: 50 mV/s.26	
Figura 4.2 Comparação por DPV entre CP e CP pré-tratado com ácido sulfúrico a 0,1 M por via eletroquímica.	27
Figura 4.3 Comparação por DPV entre CP e CP pré-tratado com hidróxido de sódio a 0,1 M por via eletroquímica.	27
Figura 4.4 Comparação por DPV entre CP e CP pre-tratado com ácido sulfúrico a 1 M por via eletroquímica.	29
Figura 4.5 Comparação por DPV entre CP e CP pré-tratado com hidróxido de sódio a 1 M por via eletroquímica	30
Figura 4.6 Resultados obtidos por DPV, com eletrodo sem pré-tratamento, para as concentrações de TMP de 0,1 μM e 0.3 μM.	31
Figura 4.7 Resultados obtidos por DPV, com eletrodo com pré-tratamento uma solução de ácido sulfúrico, por amperometria a 1 V durante 60 segundos, para as concentrações de TMP de 0,1 μM, 0,3 μM e 0,7 μM	32

Figura 4.8 Resultados obtidos por SWV, com eléctrodo sem pré-tratamento, para as concentrações de TMP de 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM	33
Figura 4.9 Resultados obtidos por SWV, com eléctrodo com pré-tratamento uma solução de ácido sulfúrico, por amperometria a 1 V durante 60 segundos, para as concentrações de TMP de 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM	34
Figura 4.10 a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para otimização do pH. b) Intensidade da corrente em função do pH. As medições foram realizadas com 1,00 μM de TMP. c) potencial do pico em função do pH.	36
Figura 4.11 Intensidade da corrente (A/cm^2) em função da amplitude (V).	37
Figura 4.12 a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para otimização da frequência b) Densidade de corrente em função da frequência.....	38
Figura 4.13 a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para otimização da amplitude b) Densidade de corrente em função do degrau de potencial.	39
Figura 4.14 a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para otimização do potencial de deposição b) Densidade de corrente em função do potencial de deposição	41
Figura 4.15 a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para otimização do tempo de deposição b) Densidade de corrente em função do tempo de deposição.....	42
Figura 4.16 Determinação do trimetoprim por SWV em tampão nas condições ótimas (pH=7, amplitude = 0,02 V, frequência=50 Hz, degrau de potencial= 0,015 V; tempo de deposição = 60 s, potencial de deposição= 0,7 V. a) Voltamogramas obtidos na análise de concentrações crescentes de trimetoprim. b) Curva de calibração na gama de 0,1 μM – 80 μM de TMP.	43
Figura 4.17 Curvas de calibração correspondentes às diferentes zonas de linearidade. a)	44
Figura 4.18 Voltamogramas obtidos por SWV na análise de uma amostra de água de rio (pH=7, amplitude= 0,02 V, frequência= 50 Hz, degrau de potencial = 0,015 V; tempo de deposição = 180 s; potencial de deposição = 0,7 V). b) Curva de calibração através do método de adição padrão.	46

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Literatura dos sensores eletroquímicos desenvolvidos para TMP.....	19
Tabela 4.1 Alturas dos picos obtidas para os ensaios realizados por DPV, com pré-tratamento a 0,1 M de ácido sulfúrico (1 V e 2 V durante 60 segundos), pré-tratamento com uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 M (1 V e 2 V durante 60 segundos) e para os ensaios com e sem pré-tratamento.	29
Tabela 4.2 Alturas dos picos obtidas para os ensaios realizados por DPV, com pré-tratamento a 1 M de ácido sulfúrico (1 V e 2 V durante 60 segundos), pré-tratamento com uma solução de hidróxido de sódio a 1 M (1 V e 2 V durante 60 segundos) e para os ensaios sem pré-tratamento.	30
Tabela 4.3 Alturas dos picos, para a técnica DPV, para concentrações de TMP de 0,1 μM e 0,3 μM – elétrodo sem tratamento – e 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM com pré-tratamento por amperometria 1 V durante 60 segundos numa solução de ácido sulfúrico.	32
Tabela 4.4 Alturas dos picos, para a técnica SWV, para concentrações de TMP de 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM – elétrodo sem tratamento – e 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM com pré-tratamento por amperometria 1 V durante 60 segundos numa solução de ácido sulfúrico.	34

Lista de abreviaturas

BDD	Diamante Dopados com Boro
BRB	Britton-Robinson
CEs	Contaminantes Emergentes
CP	Papel Fibra de Carbono
CPE	Eléttodos Pasta de Carbono
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamónio
CV	Voltametria Cíclica
DPV	Voltametria de Pulso diferencial
EPA	Potencial de Pico Anódico
EPC	Potencial de Pico Catódico
ETAR	Estações de Tratamento De Águas Residuais
GCE	Eléttodo de Carbono Vítreo
HMDE	Eléttodo de Mercúrio De Gota Suspensa
IPA	Intensidade do Pico Anódico
IPC	Intensidade do Pico Catódico
LOD	Limite de Deteção
LOQ	Limite de Quantificação
MIPs	Polímeros molecularmente impressos
MWCNT	Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla
SWCNT	Nanotubos de Carbono de Parede Simples
PPCPs	Produtos Farmacêuticos e de Cuidados Pessoais
PCP	Produtos de Cuidados Pessoais
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SPE	Eléttodos Impressos
SWV	Voltametria de onda quadrada
TMP	Trimetoprim

1 Introdução

1.1 Contaminantes emergentes, produção e distribuição

1.1.1 Contaminantes emergentes

Contaminantes emergentes (CEs) são compostos que apresentam um potencial nocivo para o meio ambiente e, conseqüentemente, para a saúde humana não havendo uma devida regulamentação, caracterização e informação quanto aos limites máximos permitidos e seus efeitos nos ecossistemas. Estes compostos têm vindo a ser detetados cada vez com mais frequência em diferentes ambientes – solo, água e ar – com origem maioritariamente antrópica, resultado de efluentes domésticos, industriais e hospitalares, atividades agrícolas, etc., ou de origem natural, por exemplo quando presentes em diferentes espécies de plantas. É assim necessário monitorizá-los de modo a perceber o seu impacto e criar medidas para a resolução ou mitigação deste problema.

São considerados CEs os fármacos, compostos usados em produtos de higiene pessoal, hormonas, drogas ilícitas, pesticidas, mioplásticos, quando de origem antropológica ou microrganismos, toxinas e algas, quando de origem natural ^[1].

Nos últimos anos tem-se notado um aumento exponencial da presença de fármacos e de produtos de higiene pessoal – *Pharmaceuticals and personal care products* (PPCPs) – em concentrações capazes de causar danos em organismos aquáticos, consequência do uso cada vez mais frequente deste tipo de produtos para melhoria do bem-estar e tratamento de doenças nos seres humanos e animais ^[2]. Estes produtos são classificados de acordo com o seu risco relativo, avaliando-se parâmetros como a persistência, bioacumulação e toxicidade ^[2].

A persistência está relacionada com quantidade e frequência com que os compostos são lançados para o meio ambiente, assim como a capacidade de remover CEs através de métodos convencionais de tratamento de águas. Nem todos os CEs são persistentes, uma vez que podem apresentar uma boa degradação, contudo o seu uso contínuo e posterior libertação para o meio ambiente faz com que sejam classificados como *pseudo-persistentes* ^[2].

Também relacionado com os PPCPs está o fator da bioacumulação. A bioacumulação é um processo pelo qual compostos químicos ou substâncias são absorvidas pelos organismos. Este processo pode ocorrer de forma direta, quando as substâncias são assimiladas a partir do meio ambiente (solo, sedimento, água)

ou de forma indireta pela ingestão de alimentos que contêm essas substâncias, sendo que em ambientes aquáticos estes processos podem ocorrer em simultâneo [3]. Embora os PPCPs sejam detetados no ambiente e água doce em baixas concentrações, muitos dos seus metabólitos podem afetar organismos aquáticos, sendo frequentemente detetados tanto em peixes e bivalves tal como em algas que compõem a maior abundância de biomassa vegetal [2].

A toxicidade dos PPCPs em meio aquático depende das suas propriedades físicas e químicas, bem como dos produtos resultantes da sua transformação. Além destes fatores é ainda importante salientar a concentração dos contaminantes no meio, a duração e o tipo de descarga e as propriedades do ecossistema que lhe permitem resistir às alterações resultantes da presença de contaminantes, como por exemplo capacidade tampão das águas ou a concentração de matéria orgânica dissolvida [4].

1.1.2 A presença de CEs no meio aquático

A presença de PPCPs no meio ambiente está, em parte, associada ao tratamento de águas residuais, nomeadamente à ineficácia ou baixa eficiência na remoção deste tipo de compostos por parte dos tratamentos mais convencionais. No tratamento de águas residuais a transformação de PPCPs pode ocorrer dependendo das propriedades físico-químicas do composto e das condições de tratamento, podendo, durante o processo, serem completamente destruídos, parcialmente transformados em metabólitos ou não sofrer qualquer alteração. Isto não implica a remoção da toxicidade, sendo expectável que um grande número de produtos de transformação com uma toxicidade e persistência não conhecida possam ainda estar presentes no efluente final bem como na água [2]. Contudo, a nível global, uma alta percentagem de efluentes acaba por não sofrer qualquer tipo de tratamento, perspetivando-se assim a presença de PPCPs em cursos de água. Mais concretamente, a contaminação das águas pode ocorrer resultando [2]:

- o consumo de PPCPs e posterior excreção e lançamento para o sistema de esgoto. Este efluente pode, posteriormente, ser utilizado para a irrigação de solos ou como fertilizante para terras agrícolas.
- do fabrico dos mesmo à escala industrial, pois a água residual da instalação pode ir diretamente para estações de tratamento de águas.
- da lixiviação do solo, podendo representar uma possível ameaça à contaminação de água potável.

- do uso de produtos de cuidado pessoal aplicados externamente, o que significa que são libertados para a rede de saneamento através de resíduos de banho, duches, lavatórios, etc.

Quando libertado para o ambiente o transporte dos PPCPs dependerá das suas características físico-químicas, propriedades e características do meio onde será inserido [2]. Os PPCPs são geralmente de natureza não volátil, polares e hidrofílicos, ou seja, a sua distribuição ocorre principalmente por meio de transporte de dispersão na cadeia alimentar [2].

A deteção de PPCPs varia não só entre países, mas também em diferentes regiões do mesmo país, ou seja, PPCPs identificados numa região de determinado país não implica que será registada a mesma concentração ou o mesmo tipo de PPCPs para outras regiões do mesmo país ou até mesmo outros países. Na Figura 1.1 está representado um gráfico da concentração (ng/l) de fármacos anti-inflamatórios não esteróides tais como Ibuprofeno, Naproxeno, Diclofenaco, Cetoprofeno e Acetaminofeno [2] detetados em amostras ambientais em diversos países.

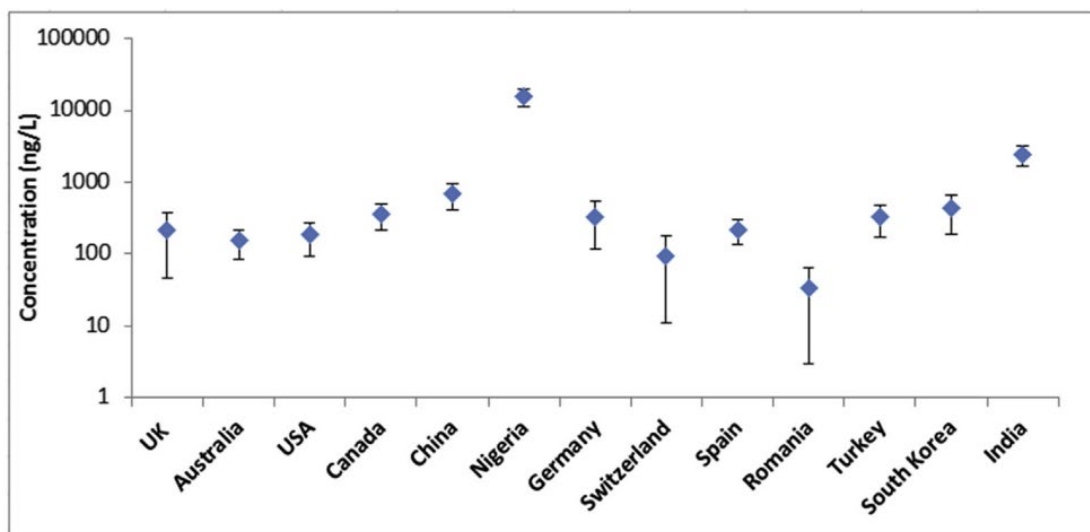


Figura 1.1 Concentração (ng/l) de fármacos anti-inflamatórios não esteróides detetados em amostras de águas superficiais de diferentes países [2]

Num estudo de monitorização em peixes foram detetadas diferentes classes terapêuticas sendo que 35% correspondiam a antibióticos, 18% antidepressivos, 11% anti-inflamatórios não esteroides, 10% anti-histamínicos e o restante de diferentes classes farmacêuticas. Já para um estudo realizado em invertebrados foram quantificados 200 produtos farmacêuticos diferentes, sendo que 34% correspondia a antibióticos, 22% a

antidepressivos, 14% a anti-inflamatórios não esteroides, e os restantes 30% a classes indiferenciadas^[5]. Quer na monitorização de peixes quer na motorização de invertebrados foram detetadas maiores concentrações de antibióticos e antidepressivos, resultado do maior consumo destes fármacos por parte da população. Só na Europa o uso de antidepressivos aumentou em 20% nos anos de 2000 a 2010, tendo-se registado um aumento similar nos Estado Unidos^[5].

1.2 A importância dos produtos farmacêuticos na contaminação do meio ambiente

Com o aumento do consumo de produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, é necessário proteger o meio ambiente da poluição de fármacos. Neste prisma é necessária a biomonitorização de produtos farmacêuticos em biota, sendo necessárias diretrizes apropriadas para a validação do método de análise químico que ajuda a garantir a confiabilidade no resultado obtido para as concentrações de contaminantes [5].

As concentrações de fármacos em águas ambientais são geralmente consideradas não tóxicas para humanos, mas o mesmo não se aplica para a vida selvagem. Ao contrário de outros poluentes persistentes mais tradicionais, os PPCPs não estão classificados como persistentes na sua maioria, mas sim como *pseudopersistentes* [5]. Os produtos farmacêuticos são normalmente projetados para atravessar membranas biológicas e, portanto, a taxa de absorção e as concentrações internas são extremamente importantes, ou seja, para entender completamente o impacto dos produtos farmacêuticos é necessário avaliar a sua ocorrência num ecossistema [5].

1.2.1 Trimetoprim e sua ocorrência em ambiente aquático

Globalmente, o consumo de antibióticos sofreu um aumento de 65% entre os anos de 2000 a 2015 [6]. O trimetoprim (TMP), o fármaco em estudo no presente trabalho, pertence à categoria dos antibióticos e é dos mais consumidos a nível global [6]. O Trimetoprim – [2,4-diamino-5-(3',4',5'-trimetoxibenzilpirimidina)] –, Figura 1.2, é um agente antibacteriano sintético que pertence ao grupo das diaminopirimidas e está entre os mais importantes antibióticos sintéticos usados em todo o mundo em medicina humana e veterinária. É usado principalmente no tratamento de infeções do trato urinário, bem como na prevenção e tratamento de infeções do trato respiratório ou gastrointestinal em animais [7].

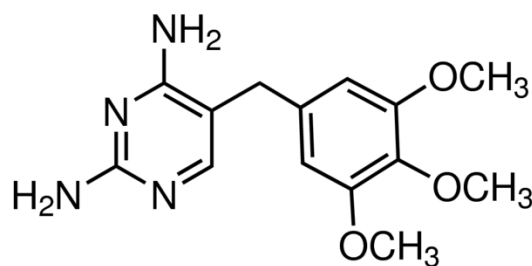


Figura 1.2 Fórmula química do TMP [8]

O TMP é um fármaco inibidor da enzima dihidrofolato redutase, que impede a produção de folato por bactérias, assim estas não podem produzir DNA e, portanto, são incapazes de aumentar em número. [9]

O TMP é regularmente acompanhado com sulfametoxazol que inibe a mesma via metabólica que o TMP e potencia ainda a ação do TMP, atuando na maioria dos patógenos bacterianos [9].

Apesar das várias aplicações do TMP este não é facilmente metabolizado pelo corpo humano assim como em outros animais e por consequência aproximadamente 80% do trimetoprim é excretado através de fezes e urina [6]. Recentemente, tem sido exponencial o aumento de contaminações de TMP em recursos de água, tendo sido detetada a sua presença graças aos avanços tecnológicos que permite a deteção de antibióticos a baixas concentrações [6]. Na Figura 1.3 está representado um esquema que demonstra as diversas origens do fármaco que provocam a sua posterior ocorrência como CE em meio aquático.

O TMP está sinalizado como um dos 14 fármacos de alto risco em águas residuais hospitalares. A utilização generalizada e intensiva deste fármaco a par do seu tempo de meia-vida de cerca de 30 dias mais a sua elevada persistência nos diferentes ecossistemas

Este fármaco é considerado persistente, ou seja, a sua taxa de degradação em meio aquático é lenta, com meia-vida de cerca de 30 dias. Quando presente em altas concentrações levanta preocupações a nível ambiental pois as bactérias podem desenvolver resistência a antibióticos. [6]. A existência de TMP e outros antibióticos em corpos de água pode influenciar a exposição de bactérias persistentes colocando, consecutivamente, os organismos aquáticos, seres humanos e outros animais em perigo pois podem ser mais facilmente expostos a infeções bacterianas resistentes a antibióticos [6].

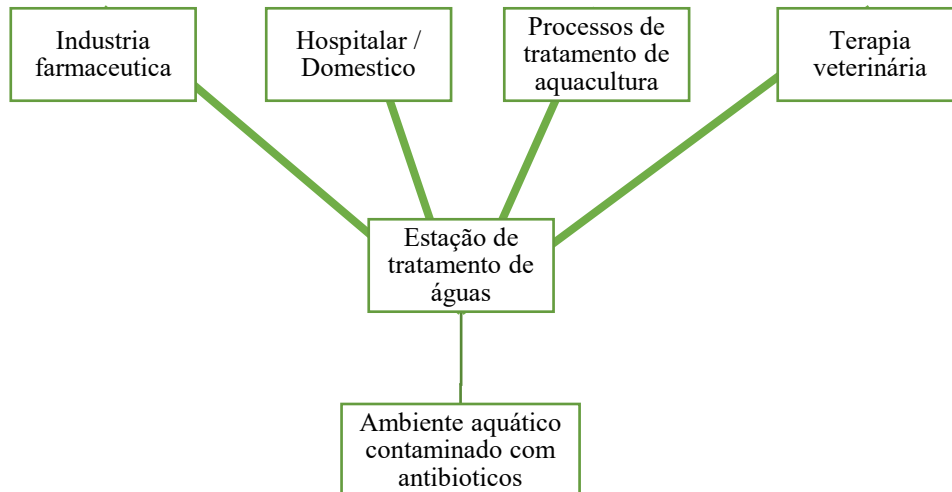


Figura 1.3 Origem da ocorrência de fármacos em ambiente aquático [6].

1.3 Métodos analíticos para a deteção de contaminantes emergentes

Atualmente, a determinação de produtos farmacêuticos em amostras abióticas e bióticas é e maioritariamente feita através de métodos de separação cromatográfica (líquida e gasosa) acoplados com detetores de espectroscopia. Isto deve-se sobretudo à fiabilidade e sensibilidade destes métodos, para além de permitirem a análise de vários compostos em simultâneo. Por outro lado, estas técnicas tendem a ser bastante dispendiosas e restritas a serem feitas no laboratório e por pessoal especializado dado a complexidade e dimensão dos equipamentos.

Em alternativa, a tecnologia de sensores é uma oportunidade ao desenvolvimento de metodologias e técnicas mais sustentáveis do ponto de vista ambiental e económico, sendo também mais simples e de fácil manuseamento podendo ser aplicadas no local de amostragem.

Na análise de contaminantes em amostras complexas, como é o caso de peixes, é necessário aplicar procedimentos de extração e pré-concentração de forma a eliminar todo um conjunto de interferentes que podem potencialmente afetar o sinal analítico. A preparação da amostra é dividida em colheita, pré-processamento, extração do analito e limpeza ou pré-concentração. Normalmente é feita extração em fase sólida podendo-se aplicar certos sais para ajudar a partição. Contudo a utilização desta técnica pode não fornecer recuperação suficiente de todos os compostos relevantes, o que leva a que alguns destes compostos permanecem indetetáveis ^[5]. As propriedades físico-químicas dos analitos são importantes uma vez que têm um efeito direto no desenvolvimento e desempenho dos métodos analíticos ^[5].

A medição com confiança vai depender da recuperação do analito, da interferência do mesmo na matriz, do tamanho da amostra e seus constituintes, a química do solvente (características como o pH, volume, concentração de sais, etc.), química do analito e condições de operação (temperatura, agitação, etc.) ^[5].

1.4 Sensores eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos podem ser uma boa solução na análise de fármacos no meio ambiente. Sucintamente, a eletroquímica foca-se no estudo de reações químicas que envolvem transferência de eletrões, através de reações de oxidação-redução ^[10]. Assim, compostos farmacêuticos eletroativos, isto é, capazes de receberem (reduzir) ou cederem eletrões (oxidar) podem ser detetados por este princípio. As técnicas eletroquímicas são extremamente vantajosas quando comparadas com outros métodos devido à sua elevada sensibilidade, portabilidade, custo moderado e versatilidade. Esta última acontece, pois, é possível controlar as reações modificando a interface eléctrodo-solução e através da seleção criteriosa do potencial aplicado às células. Outras vantagens das técnicas eletroquímicas são a facilidade de automação e a compatibilidade ambiental, uma vez que o reagente utilizado é o eletrão ^[11].

Existem, no entanto, desvantagens para a utilização destes métodos, como por exemplo a interação entre o eléctrodo e a amostra que pode provocar irreprodutibilidade nas medições ^[11] ou limitações na discriminação de vários compostos presentes na amostra.

1.4.1 Voltametria cíclica

Uma das técnicas eletroquímicas mais usadas é a volumetria cíclica (CV) que estuda processos de oxidação-redução de espécies moleculares e também reações de catálise ^[10].

Na Figura 1.4 é possível observar um voltamograma para uma espécie à base de ferro envolvendo a transferência de 1 eletrão, onde no eixo dos x está representado o potencial aplicado (V) e no eixo dos y a corrente resultante (A) ^[10].

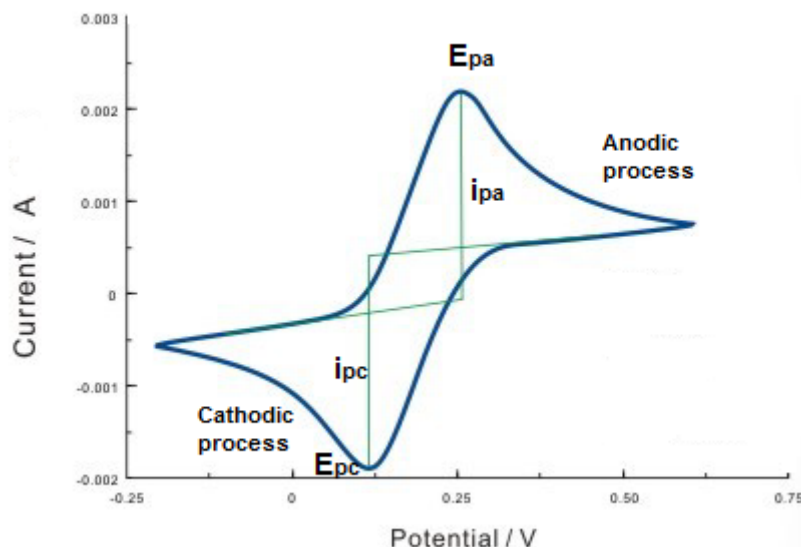


Figura 1.4 Voltamograma cíclico típico para o processo de oxidação-redução da espécie hexacianoferrato com representação do potencial de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) e determinação da intensidade do pico anódico (i_{pa}) e catódico (i_{pc})^[6].

Observando o voltamograma da Figura 1.4 é possível observar 2 picos, intensidade do pico anódica (i_{pa}) e intensidade do pico catódica (i_{pc}) com semelhante intensidade correspondentes ao processo de oxidação-redução da espécie hexacianoferrato. O equilíbrio eletroquímico pode ser explicado através da equação de Nernst (Equação 1.1), que relaciona o potencial eletroquímico de célula ao potencial padrão de uma espécie e concentração da espécie oxidada e reduzida^[10].

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{Ox}{Red} \quad (\text{Equação 1.1})$$

Onde:

E⁰ – potencial padrão de uma espécie

Ox – Concentração do analito oxidado no sistema em equilíbrio

Red – Concentração do analito reduzido no sistema em equilíbrio

F – Constante de Faraday

R – Constante universal dos gases perfeitos

n – Número de eletrões

T – Temperatura

Esta equação permite prever a forma de como um sistema responderá a uma mudança de concentração de espécies em solução alguma ou a uma mudança no potencial de elétrodo^[10]. No geral, a voltametria cíclica permite obter informações sobre a cinética

das reações eletroquímicas que se dão à superfície do eléctrodo. É possível assim perceber o estado dessa superfície, assim como avaliar a eficiência de possíveis modificações da superfície que possam beneficiar ou não da transferência de electrões entre eléctrodo e espécie em solução. Um dos parâmetros importantes desta técnica é a taxa de varredura que controla a rapidez com que o potencial é varrido, em que com o aumento da taxa de varredura ocorre uma diminuição no tamanho da camada de difusão o que leva a correntes mais altas^[10].

1.4.2 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (DPV) é outra técnica eletroquímica frequentemente usada na deteção de analitos dada a sua alta sensibilidade. Consiste na aplicação de pulsos de potencial curtos e de baixa amplitude numa rampa linear de potencial em que a corrente é medida antes da aplicação do pulso (Figura 1.5).

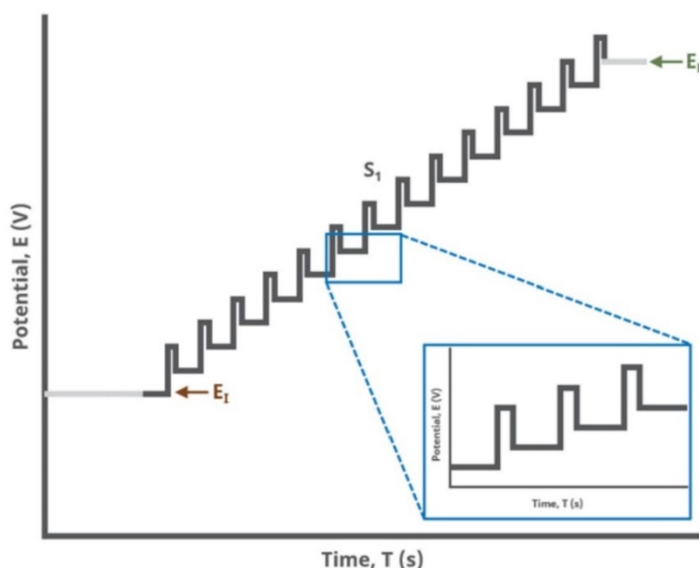


Figura 1.5 Aumento da tensão de base ao longo do tempo para voltametria diferencial de pulso^[12].

É uma técnica muito utilizada pois tem a vantagem de minimizar o efeito de *background* durante uma análise. O facto de os pulsos serem pequenos faz com que esta técnica seja bastante sensível melhorando assim a precisão^[12].

O esquema de montagem de um sistema DPV envolve dois eléctrodos, o eléctrodo de trabalho e o contra eléctrodo. Os pulsos são transmitidos pelo contra eléctrodo enquanto o eléctrodo de trabalho mede a corrente resultante. Existe ainda um terceiro eléctrodo, o eléctrodo de referência que ajuda a controlar a tensão do contra eléctrodo. Na Figura 1.6 está apresentado o esquema de montagem de um circuito para medição DPV^[12].

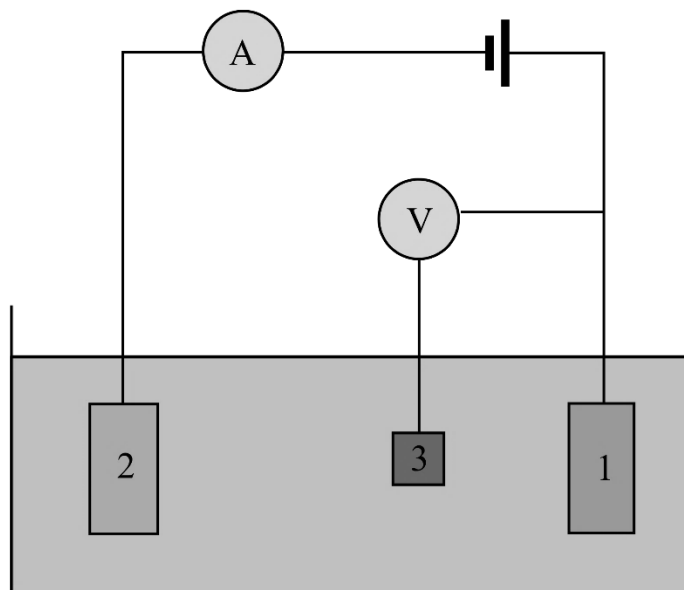


Figura 1.6 Esquema de montagem de um circuito para medição DPV. 1)elétrodo de trabalho, 2) contra elétrodo, 3) elétrodo de referência [12].

1.4.3 Voltametria de onda quadrada

Uma outra técnica amplamente usada em determinações analíticas é a voltametria de onda quadrada (SWV). É uma técnica voltamétrica de pulso rápido e sensível, tendo limites de deteção bastantes baixos. Na Figura 1.7 encontra-se o esquema da voltametria de onda quadrada [13].

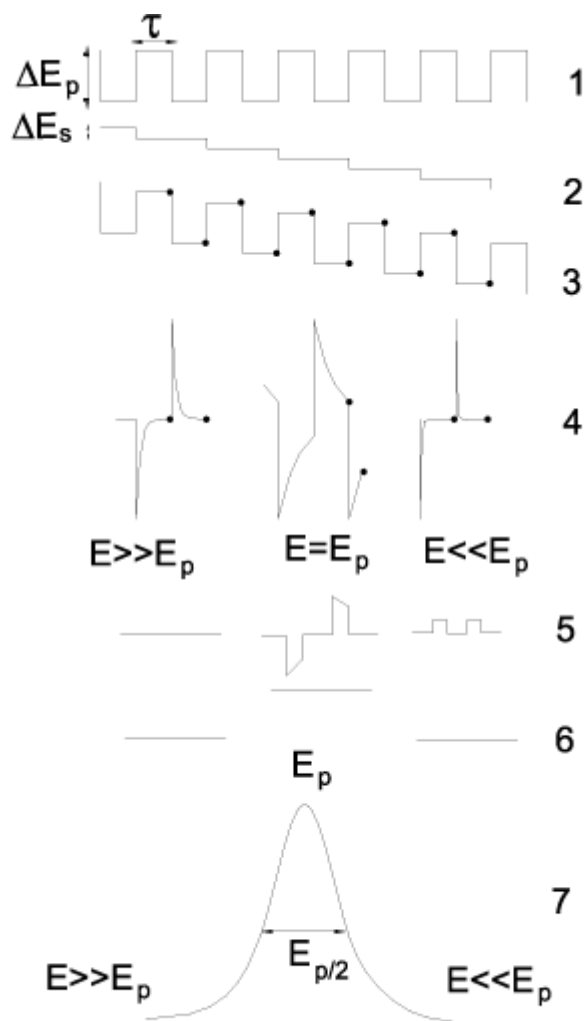


Figura 1.7 Representação esquemática da voltmetria de onda quadrada, onde: 1) potencial na forma de onda; 2) escala de potencial; 3) forma de aplicação do potencial na SWV; 4) forma da onda da corrente; 5) sinal da corrente; 6) corrente diferencial e 7) corrente total ^[13].

Na Figura 1.8 é possível observar voltamogramas teóricos associados reacções reversíveis e irreversíveis, 1 e 2, respetivamente ^[13].

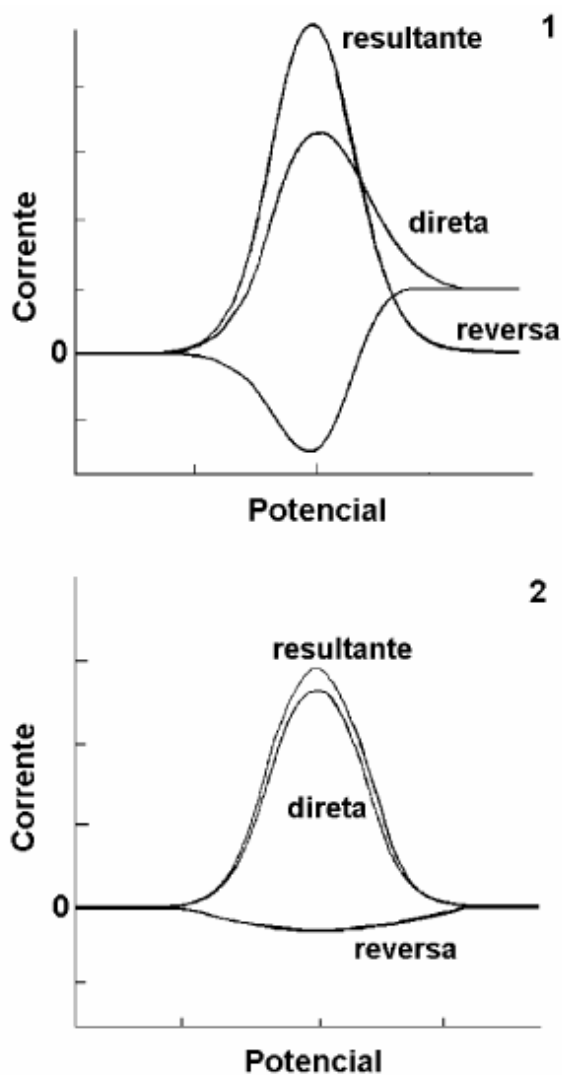


Figura 1.8 Voltogramas esquemáticos de onda quadrada [13].

A SWV apresenta vantagens quando comparada com outras técnicas, pois é possível obter picos bem definidos para altas velocidades de varredura melhorando assim a sensibilidade. Devido ao facto de serem realizadas varreduras consecutivas é possível reduzir ainda o ruído de fundo [13].

1.5 Eléttodos

Em eletroanálise recorre-se normalmente a três eléttodos para as determinações, nomeadamente o eléttodo de trabalho, referência e contra eléttodo. O eléttodo de referência dá uma referência do potencial que se está a aplicar enquanto no contra eléttodo ocorre a reação inversa ao eléttodo de trabalho e serve para completar um circuito elétrico, sendo que a corrente irá ser registada como o fluxo de eletrões entre o eléttodo de trabalho e o contra eléttodo. O eléttodo de trabalho é o mais importante, ocorrendo as reações de maior interesse na interface do eletrólito e superfície do eléttodo.

A escolha do material do eléttodo de trabalho é crítica por forma a obter-se uma boa condutividade de eletrões, traduzindo-se em altas cinéticas de transferência de eletrões entre a superfície e o composto alvo em solução. Existe uma variedade de materiais utilizados em eléttodos de trabalho onde metais nobres e carbono se apresentam como os mais usados atualmente. O carbono é um dos materiais mais utilizados devido à sua ampla janela de potencial, resistência química e baixo custo. Com o objetivo de melhorar a eficiência à transferência de eletrões os eléttodos podem ser modificados com diversos nanomateriais que promovem uma maior área de superfície do eléttodo. Os nanomateriais frequentemente usados são à base de carbono como por exemplo, nanotubos de carbono de parede simples e múltipla (single-walled carbon nanotube, SWCNT e multi-walled carbon nanotube, MWCNT) e grafeno e os à base de partículas metálicas como por exemplo nanopartículas de ouro e óxidos de ferro e zinco. Contudo nem sempre é vantajosa a modificação da superfície do eléttodo e assim o uso do próprio eléttodo sem qualquer modificação pode ser suficiente para se obter um bom sinal analítico.

1.6 Sensores eletroquímicos para a determinação de Trimetoprim

Existem várias técnicas para a deteção de TMP, como por exemplo cromatografia líquida, cromatografia gasosa, espectrofotometria, entre outras. Estas técnicas apresentam, no entanto, algumas desvantagens quando comparadas com técnicas eletroquímicas, nomeadamente, são técnicas mais demoradas, mais caras, com equipamentos e metodologias complexas precisando de pessoal altamente especializado para a sua operação. As técnicas eletroquímicas são, por outro lado, de fácil deteção, de operação simples, requerem equipamentos baratos para além da vantagem de os sistemas eletroquímicos poderem ser miniaturizados [6].

Na Tabela 1.1 estão apresentados sensores eletroquímicos já desenvolvidos para a deteção de TMP. É possível verificar que o eléctrodo de carbono vítreo (glassy carbon electrode, GCE) foi o mais usado para o estudo analítico de TMP, envolvendo sempre algum tipo de modificação da sua superfície com nanomateriais de carbono e/ou metálicos para se obter baixos limites de deteção. Um exemplo é o trabalho de Bhengo et al. [15] no qual desenvolveram um sensor baseado no eléctrodo GCE modificado com nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) e MWCNT para determinação simultânea de sulfamethoxazole e TMP. A superfície do GCE foi modificada por deposição de gota após as nanopartículas de Fe_3O_4 serem sintetizadas à superfície dos MWCNT pelo método de co-precipitação. Em condições ótimas (tampão Britton-Robinson, pH 6) e aplicação da técnica voltametria de pulso diferencial (DPV – differential pulse voltammetry) o TMP foi determinado a 1,15 V numa curta gama linear de concentração de 0,1 a 0,5 μM , obtendo-se um limite de deteção (LOD) de 0,021 μM . Este sensor foi depois validado em diferentes tipos de amostras, nomeadamente água, urina e comprimidos [15]. Por sua vez Golinelli et al. [16] optaram por modificar o GCE com um compósito de grafeno reduzido (rGO) e nanopartículas de prata (AgNPs), sendo esta mistura depositada na superfície previamente pré-tratada do GCE. A aplicação da técnica DPV a um pH ótimo de 8 resultou numa gama linear mais alargada para TMP de 1 a 10 μM , mas num valor de LOD cerca de 20 vezes superior [16] relativamente ao sensor descrito anteriormente. Outros sensores baseados no uso do eléctrodo GCE modificado com compósitos constituídos por materiais de carbono e metálicos foram utilizados na deteção de TMP com resultados semelhantes em termos de LOD [8],[14]. A este respeito, nanopartículas sintetizadas de óxido de zinco (ZnO) foram misturadas com grafeno por ultrasonicação, sendo a mistura resultante depositada

no GCE previamente limpo. Este sensor quando aplicado à deteção de TMP por DPV a um pH ótimo de 7 revelou uma ampla gama de linearidade (1 a 180 μM) e um LOD de 0,3 μM , sendo ultimamente validado em amostras de água canalizada e de lago, urina e soro [8]. A conjugação de negro de fumo especificamente designado por Printex L6 (PC) e ftalocianinas de cobre (CuPh) foi também testada na determinação de TMP. Com este sensor composto pela modificação de GCE com a mistura compósita obteve-se um LOD de 0,6 μM em condições ótimas de pH (7) por SWV [14]. O uso de pastas carbonáceas como eléctrodos, denominados por eléctrodos pasta de carbono (CPE) foram também aplicados na deteção de TMP. Mais concretamente, dois trabalhos muito similares foram desenvolvidos pelos mesmos autores consistindo em CPEs modificados simplesmente por dodecilsulfato de sódio (SDS) num caso [17] e por brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) no outro caso [18], registando LODs de 0,14 μM e 0,15 μM respetivamente. Ambos os compostos usados na modificação do CPE são surfactantes que auxiliam na transferência de eletrões aumentando assim o sinal analítico. Os CPEs tradicionais são feitos através da mistura de grafite e parafina formando uma pasta condutora. No trabalho desenvolvido por Cesarino et al. [19] a grafite foi substituída por uma mistura nanocompósita de MWCNT com nanopartículas de antimónio (SbNPs). Este sensor CPE altamente nanoestruturado revelou uma alta sensibilidade para TMP alcançando um LOD de 0,031 μM , sendo assim muito abaixo dos valores alcançados pelos outros sensores à base de CPE descritos anteriormente. Muito interessantes e pertinentes na análise de compostos são os eléctrodos impressos (screen-printed electrodes, SPE) devido ao seu reduzido tamanho e capacidade de portabilidade embora também necessitem de um certo nível de nanoestruturação para obtenção de um bom sinal analítico. Um bom exemplo é o sensor SPE desenvolvido por Sgobbi et al [20] estando os três eléctrodos miniaturizados e integrados no mesmo substrato. O eléctrodo de trabalho feito de tinta de carbono foi posteriormente modificado com MWCNT impregnado com azul de Prússia com forma de nanocubos (PBnc). Este sensor descartável apresentou uma gama de linearidade entre 0,1 a 10 μM e um baixo limite de deteção correspondente a 0,06 μM [20]. Uma forma de deteção simples diz respeito ao uso de eléctrodos de diamante dopados com boro (BDD) uma vez que não costumam ser modificados, apenas necessitando de um pré-tratamento para alcançar bons resultados analíticos. É o caso de ambos os trabalhos de Andrade et al [21], [22] em que os sensores à base de BDD alcançaram LODs correspondentes a 0,014 [21] e 0,052 μM [22] sendo validados em amostras de leite e compostos farmacêuticos. Contudo

este tipo de elétrodos é caro. Outro exemplo de eletrodo não modificado aplicado para detecção de TMP é o de mercúrio (eletrodo de mercúrio de gota suspensa, HMDE). Apesar de serem altamente sensíveis (LOD de 0,01 μM) e reprodutíveis este tipo de elétrodos estão em desuso devido às suas características potencialmente tóxicas [23].

A literatura demonstrou assim uma falta de sensores que sejam simples, baratos e de tamanho reduzido para a detecção deste tipo de antibiótico podendo assim constituir uma oportunidade de investigação interessante.

Tabela 1.1 Literatura dos sensores eletroquímicos desenvolvidos para TMP

Configuração do sensor	Técnica de deteção	Gama de linearidade (μM)	Limite de deteção (μM)	Amostra	Referência
Fe₃O₄-MWCNT/GCE	DPV	0,1–0,5	0,021	Água, urina, comprimidos	[15]
AgNPs-rGO/GCE	DPV	1–10	0,4	Água residual	[16]
GR-ZnO/GCE	DPV	1–180	0,3	Água lago, urina, soro	[8]
CuPh/PC/GCE	SWV	1,5–6,0	0,6	Água natural	[14]
MoO₂/GCE	DPV	2,00-20,0	0,127	-	[24]
SDS/CPE	DPV	-	0,14	-	[17]
CTAB/CPE	DPV	-	0,15	-	[18]
MWCNT-SbNPs/CPE	DPV	0,1-0,7	0,031	Águas naturais	[19]
MWCNT-PBnc/SPE	DPV	0,1–10	0,06	Águas residuais	[20]
BDD	Amperometria	0,08-1,37	0,052	Leite	[21]
BDD	DPV	-	0,014	Fármacos	[22]
BDD	Amperometria	6,9-138	0,52	Compostos farmacêuticos	[25]
HMDE	SWASV	-	0,01	Suspensões farmacêuticas	[23]
(TM)₃PM -PVC-DOP (ESI)	Potenciometria	2,3-10000	-	Comprimidos farmacêuticos	[26]

Fe₃O₄: Óxido de ferro (II, III), MWCNT: nanotubo de carbono de paredes múltiplas; GCE: elétrodo de carbono vítreo, PBnc: Nanopartículas de *Prussian Blue*; SPE: elétrodos serigrafados de carbono rGO: óxido de grafeno reduzido; AgNPs Nanopartículas de Prata; GR: grafeno, CuPh ftalocianina de cobre, PC: Carbonato de propileno, BDD: diamante dopado com boro, (TM)₃PM trimetoprimo-fosfomolibdato, PVC policloreto de vinilo, DOP: dioctilo ftalato; ESI: elétrodo seletivo de iões; PPy: Polipirrole; SDS; Sódio Dodecyl Sulphate HMDE; elétrodo de mercúrio de gota suspensa; SWASV Square-wave adsorptive stripping voltammograms.

2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um sensor eletroquímico capaz de detetar o trimetoprim, tendo para isso, sido utilizado papel de fibra de carbono.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Otimizar e avaliar as técnicas eletroquímicas mais sensíveis ao TMP;
- Avaliar a influência do pré-tratamento no sinal analítico;
- Estudar o comportamento eletroquímico do fármaco;
- Otimizar as condições analíticas (pH da solução e parâmetros da técnica selecionada);
- Determinação da curva de calibração;
- Aplicação do sensor para deteção de TMP em água.

3 Metodologia experimental

3.1 Equipamento experimental

O equipamento utilizado para a realização das medições voltamétricas foi um potencióstato Metrohm Autolab e para a obtenção dos dados foi utilizado um Software GPES.

Para os ensaios foi utilizado um sistema de três elétrodos, o eletrodo de referência, o eletrodo trabalho e o contra eletrodo. O eletrodo de trabalho corresponde a papel de fibra de carbono e durante a realização dos ensaios este foi revestido numa das extremidades com papel de alumínio.

3.2 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados para a realização dos ensaios foram ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 95 - 97%), hidróxido de sódio (NaOH, 98%), fosfato dissódico (Na_2HPO_4), fosfato monossódico (NaH_2PO_4) e o fármaco em estudo, trimetoprim.

3.3 Procedimento experimental

Inicialmente, e para avaliar o comportamento do fármaco, foi realizado um ensaio por voltametria cíclica (CV), com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s e concentração de TMP 50 μ M, diluído numa solução tampão fosfato com pH igual a 4.5. Esta técnica foi realizada com o eletrodo sem pré-tratamento e com pré-tratamento. O pré-tratamento foi realizado por amperometria, a 1 V durante 60 segundos, com soluções de H_2SO_4 .

Para avaliar qual a técnica mais sensível para o TMP, foram realizados ensaios por DPV e SWV com o eletrodo sem pré-tratamento e com pré-tratamento. Inicialmente o pré-tratamento foi realizado em meio ácido, com soluções de H_2SO_4 e posteriormente em meio alcalino com soluções de NaOH, para concentrações de fármaco igual a 10 μ M.

O pré-tratamento foi realizado por amperometria, a 1 V durante 60 segundos, com soluções de H_2SO_4 a 1 M e 0,1 M e também por amperometria, a 1 V durante 60 segundos, com soluções de NaOH a 1 M e 0,1 M.

Para avaliar a influência do pré-tratamento na leitura do pico para o trimetoprim, o mesmo pré-tratamento foi aplicado para as mesmas concentrações de base e ácido, mas realizado a 2 V durante 60 segundos.

Foram realizados ensaios sem pré-tratamento do CP e CP com pré-tratamento usando uma solução de ácido sulfúrico, por amperometria a 1 V durante 60 segundos, para as concentrações de TMP de 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM , quer por DPV quer por SWV.

Após seleção da técnica (SWV) foram determinadas as condições ótimas, nomeadamente a otimização do pH, da amplitude, do degrau de potencial e frequência.

Para a otimização do pH foram testados diferentes valores, nomeadamente, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 usando como eletrólito a solução tampão Britton-Robinson (BRB) 0,1 M contendo uma concentração de TMP de 10 μM .

Na otimização da amplitude, para pH igual a 7, foram feitas leituras para valores de amplitude entre 0,002 V e 0,18 V para uma concentração de fármaco 10 μM . No que concerne à otimização da frequência para um pH igual a 7 e amplitude igual a 0,02 V foram realizados ensaios entre 10 Hz e 250 Hz. Por fim foram realizados ensaios para a determinação do degrau de potencial. Tendo sido avaliado ao degrau de potencial entre os valores 0,001 V e 0,03 V.

Após selecionadas as condições ótimas para a determinação do TMP por SWV, foram realizados ensaios para avaliar o potencial de deposição e o tempo de deposição. Estes ensaios tiveram como objetivo pré concentrar o analito na superfície do eletrodo. O potencial de deposição foi variado entre 0 e 1,1 V e o tempo de deposição entre 0 s e 180 s nas condições ótimas determinadas.

Traçou-se ainda uma curva de calibração, para isso foram adicionadas alíquotas de solução padrão de TMP analisando-se uma gama de concentrações entre 0,1 μM – 100 μM .

A validação do sensor foi feita numa amostra ambiental, nomeadamente água de rio coletada após uma estação de tratamento de águas residuais. Como pré-tratamento, a água foi diluída em tampão BRB 0,2 M na razão de 1:1, sendo analisada diretamente logo de seguida.

4 Resultados e discussão

4.1 Otimização do pré-tratamento a conferir ao CP

A escolha da técnica a utilizar para a determinação do fármaco em estudo representa um passo crucial para uma boa avaliação de resultado e posterior aplicação numa amostra real. A técnica a utilizar deverá ser sensível ao fármaco e, como tal, é necessário avaliar o comportamento do mesmo para uma leitura mais correta.

As técnicas utilizadas para a avaliação do comportamento eletroquímico e determinação do fármaco foram a voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada. Para cada uma destas técnicas foram avaliados os voltamogramas obtidos com o eléctrodo pré-tratado e sem pré-tratamento. O pré-tratamento é um procedimento aplicado à superfície do eléctrodo (neste caso ao papel de fibra de carbono) para alterar e/ou limpar a superfície onde ocorre a reação, na tentativa de melhorar os resultados do voltamograma obtido.

Na Figura 4.1 está apresentada a comparação por CV entre o eléctrodo pré-tratado com ácido sulfúrico 0,1 M por via eletroquímica através de CV (100 mV/s, 50 varrimentos) e sem tratamento. A CV foi realizada com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s e para uma concentração de TMP 50 μ M, diluído numa solução tampão fosfato com pH igual a 4,5. Analisando esta figura pode-se averiguar que a realização de um pré-tratamento não provocou uma melhoria de sinal, uma vez que as intensidades do pico do TMP a cerca de 1,2 V são semelhantes.

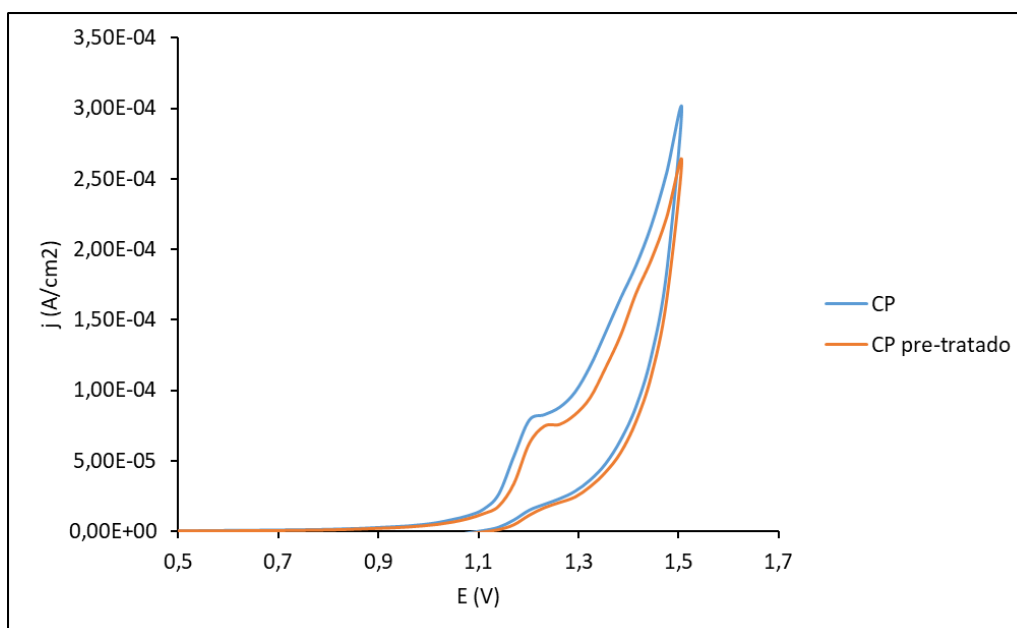


Figura 4.1 Comparação por CV entre CP e CP pré-tratado com ácido sulfúrico por via eletroquímica para 50 μM TMP em PBS pH 4,5. Velocidade de varrimento: 50 mV/s.

Depois desta análise foram realizados ensaios com a técnica DPV e SWV sendo estas técnicas muito mais sensíveis do que a técnica CV, comparando elétrodos sem pré-tratamento e pré-tratados por via eletroquímica em H_2SO_4 ou NaOH em diferentes concentrações (0,1 e 1 M).

Na Figura 4.2 é possível observar os voltamogramas obtidos por DPV com o pré-tratamento em ácido sulfúrico e sem pré-tratamento. O pré-tratamento foi feito em 0,1 M H_2SO_4 por amperometria comparando-se também o potencial aplicado de 1 V e 2 V durante 60 segundos.

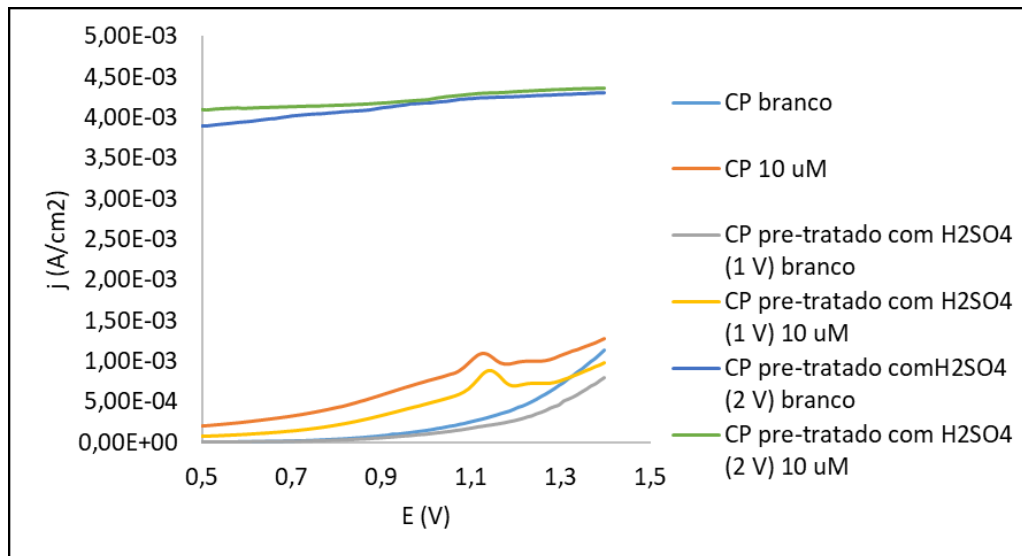


Figura 4.2 Comparação por DPV entre CP e CP pré-tratado com ácido sulfúrico a 0,1 M por via eletroquímica.

Verifica-se na Figura 4.2 que na presença de 10 μM de TMP os picos para o elétrodo sem pré-tratamento e tratado por amperometria 1 V são muito semelhantes em forma, o que não se verifica quando pré-tratado com amperometria 2 V uma vez que a linha de base aumenta muito podendo ocultar o pico de oxidação do TMP.

Na Figura 4.3 estão representados os voltamogramas obtidos por DPV com o pré-tratamento em hidróxido de sódio e sem pré-tratamento. O pré-tratamento foi feito em 0,1 M NaOH por amperometria tanto a 1 V como 2 V durante 60 segundos.

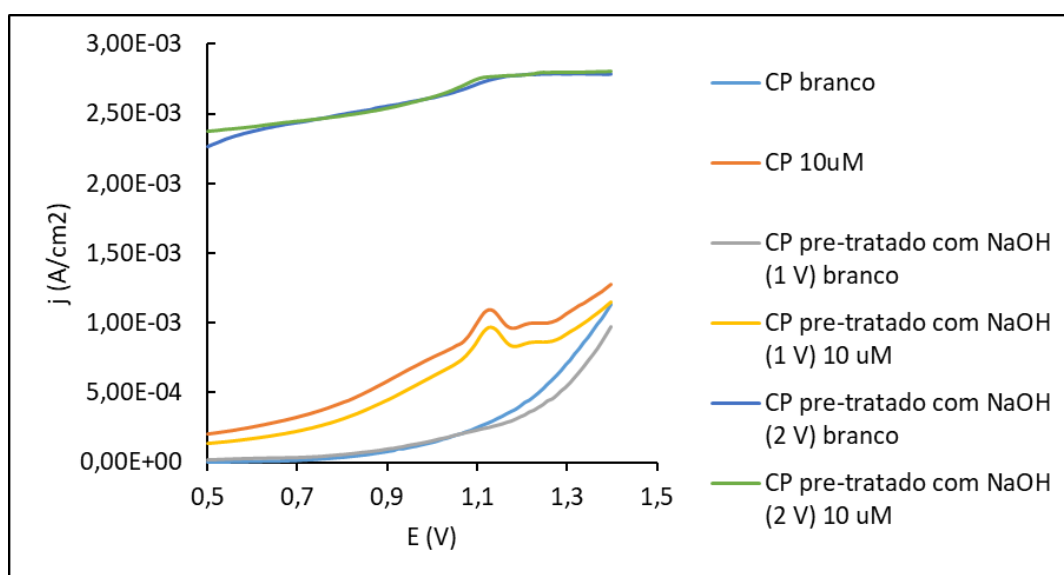


Figura 4.3 Comparação por DPV entre CP e CP pré-tratado com hidróxido de sódio a 0,1 M por via eletroquímica.

Os resultados obtidos na Figura 4.3, avaliando o pré-tratamento em NaOH a diferentes potenciais amperométricos são semelhantes aos obtidos com pré-tratamento em H₂SO₄. Verifica-se assim que aumentando o potencial aplicado aquando do pré-tratamento do eléctrodo (de 1 V para 2 V) prejudica o desempenho eletroquímico do CP na oxidação do TMP. Avaliando os picos obtidos aquando da determinação da TMP nos ensaios realizados, apresentados na Tabela 4.1, a altura dos picos não varia muito quando feito o processo de pré-tratamento que com H₂SO₄ quer com NaOH, sendo que o maior pico obtido foi o realizado com o eléctrodo pré-tratado com ácido sulfúrico a 0,1 M, 1 V durante 60 segundos, embora não seja um aumento muito significativo.

Tabela 4.1 Alturas dos picos obtidas para os ensaios realizados por DPV, com pré-tratamento a 0,1 M de ácido sulfúrico (1 V e 2 V durante 60 segundos), pré-tratamento com uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 M (1 V e 2 V durante 60 segundos) e para os ensaios com e sem pré-tratamento.

Eléctrodo	Altura do pico	Área do eléctrodo	Altura/área
CP 1	$1,88 \times 10^{-04}$	0,7	$2,69 \times 10^{-04}$
CP (0,1 M H ₂ SO ₄ , 1 V, 60 s)	$2,13 \times 10^{-04}$	0,7	$3,04 \times 10^{-04}$
CP (0,1 M H ₂ SO ₄ , 2 V, 60 s)	-	0,72	-
CP (0,1 M NaOH, 1 V, 60 s)	$1,88 \times 10^{-04}$	0,7	$2,69 \times 10^{-04}$
CP (0,1 M NaOH, 2 V, 60 s)	-	0,84	-
CP 2	$1,52 \times 10^{-04}$	0,63	$2,41 \times 10^{-04}$

Analogamente ao pré-tratamento anterior, procedeu-se, com a mesma técnica (DPV), com eléctrodos pré-tratados com soluções de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, mas desta vez aumentando a concentração tanto do ácido como da base para a 1 M. Este procedimento foi realizado para com as duas soluções por amperometria a 1 V e posteriormente 2 V durante 60 segundos. Nas Figuras 4.4 e 4.5 é possível observar os resultados obtidos para os ensaios descritos acima, e na Tabela 4.2 a comparação entre as alturas dos picos obtidos com pré-tratamento a 1 M de ácido sulfúrico (1 V e 2 V durante 60 segundos), pré-tratamento com uma solução de hidróxido de sódio a 1 M (1 V e 2 V durante 60 segundos) e para os ensaios sem pré-tratamento.

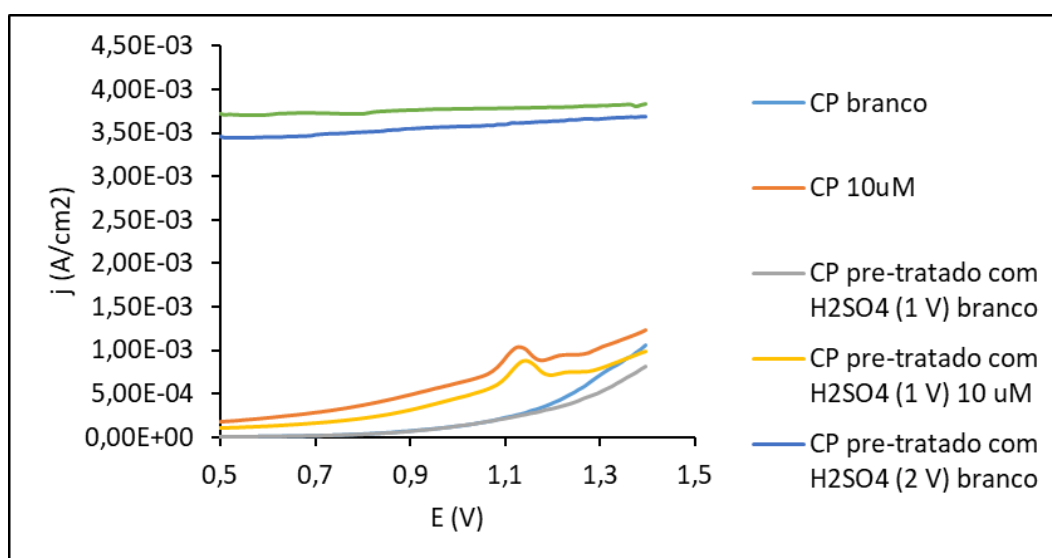


Figura 4.4 Comparação por DPV entre CP e CP pre-tratado com ácido sulfúrico a 1 M por via eletroquímica.

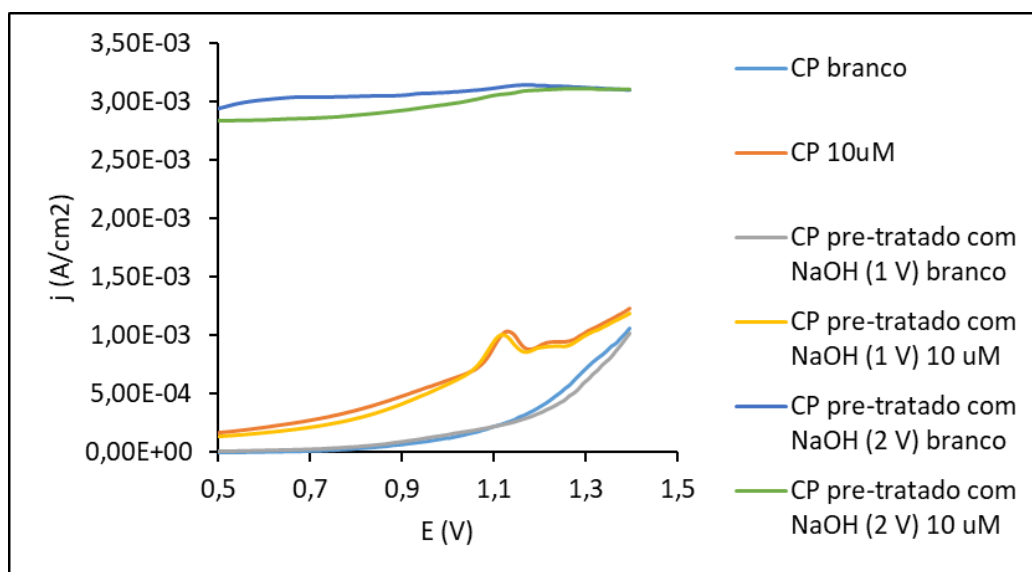


Figura 4.5 Comparação por DPV entre CP e CP pré-tratado com hidróxido de sódio a 1 M por via eletroquímica

Os resultados obtidos foram semelhantes aos anteriores, não se tendo verificado nenhuma diferença significativa entre a altura dos picos para os diferentes pré-tratamentos. Embora sejam muito semelhantes, o que mostrou ter um pico maior foi o elétrodo com pré-tratamento com uma solução de NaOH a 1 M, 1 V durante 60 segundos, tal como observado na Tabela 4.2.

Também para estas concentrações mais elevadas de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio não foi possível detetar o fármaco aquando do pré-tratamento a 2 V durante 60 segundos, não sendo assim eficaz o uso de um potencial elevado no pré-tratamento do CP.

Tabela 4.2 Alturas dos picos obtidas para os ensaios realizados por DPV, com pré-tratamento a 1 M de ácido sulfúrico (1 V e 2 V durante 60 segundos), pré-tratamento com uma solução de hidróxido de sódio a 1 M (1 V e 2 V durante 60 segundos) e para os ensaios sem pré-tratamento.

Elétrodo	Altura do pico	Área do elétrodo	Altura/área
CP (1 M H ₂ SO ₄ , 1 V, 60 s)	1,89x10 ⁻⁰⁴	0,665	2,84x10 ⁻⁰⁴
CP (1 M H ₂ SO ₄ , 2 V, 60 s)	-	-	-
CP (1 M NaOH, 1 V, 60 s)	1,88x10 ⁻⁰⁴	0,63	2,98x10 ⁻⁰⁴
CP (1 M NaOH, 2 V, 60s)	-	-	-
CP	1,42x10 ⁻⁰⁴	0,54	2,63x10 ⁻⁰⁴

Comparando os pré-tratamentos no que concerne à concentração do ácido ou da base – 0,1 M ou 1 M – os resultados são muito semelhantes não havendo melhorias muito

significativas. Contudo o pico melhor definido continua a ser o pico resultado da leitura do TMP com elétrodo pré-tratado com uma solução de ácido sulfúrico a 0,1 M, a 1 V durante 60 segundos. Todos estes ensaios foram realizados com uma concentração de fármaco numa solução tampão de fosfato (pH=4,5) de 10 μM .

A fase seguinte consistiu em analisar o fármaco a concentrações mais baixas para perceber a sensibilidade da técnica. Este passo é crucial para a escolha da técnica pela qual se vai optar.

Foram realizados ensaios para técnicas DPV e SWV, com concentrações de fármacos de 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM . Além dos ensaios num elétrodo não tratado, também foram realizados, para as mesmas concentrações de TMP, ensaios em elétrodos pré-tratados com ácido sulfúrico por amperometria a 1 V durante 60 segundos.

Na Figura 4.6 estão apresentados os resultados obtidos por DPV, com um elétrodo sem pré-tratamento, embora ténue é possível observar o pico que representa a presença de TMP em solução. Como era de esperar, quanto maior concentração de fármaco, maior a intensidade do pico.

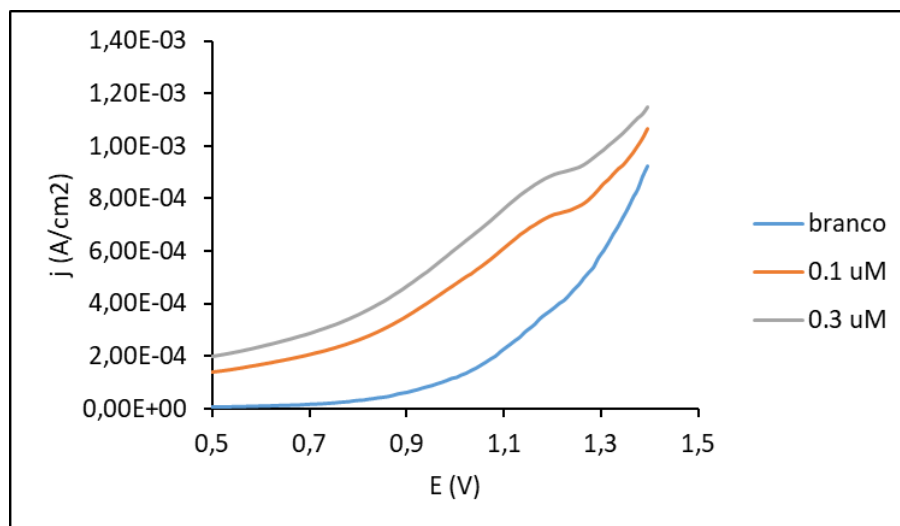


Figura 4.6 Resultados obtidos por DPV, com elétrodo sem pré-tratamento, para as concentrações de TMP de 0,1 μM e 0,3 μM .

Na Figura 7.7 estão apresentados os resultados obtidos por DPV, com elétrodo com pré-tratamento de uma solução de ácido sulfúrico, por amperometria a 1 V durante 60 segundos, para as concentrações de TMP de 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM . Analogamente ao

anterior, o pico existe, embora ténue e com o aumento da concentração, aumenta também a intensidade do pico.

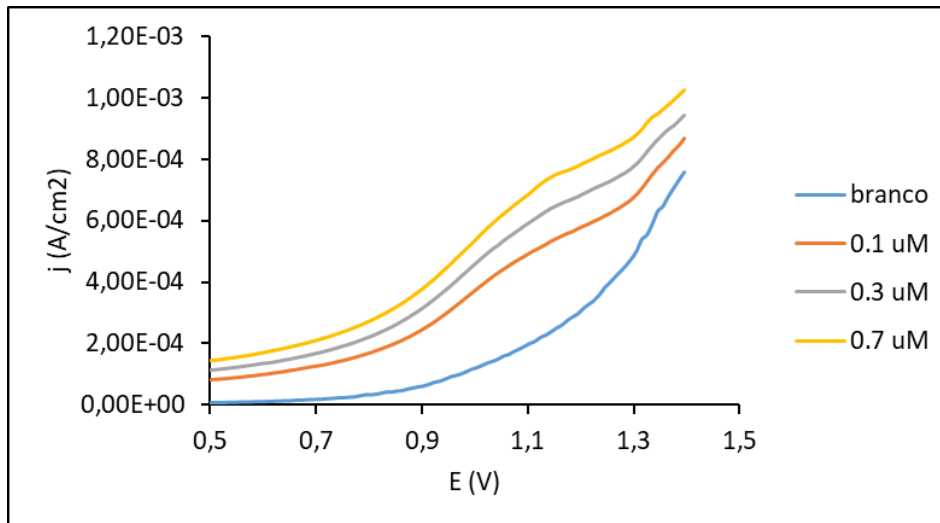


Figura 4.7 Resultados obtidos por DPV, com elétrodo com pré-tratamento uma solução de ácido sulfúrico, por amperometria a 1 V durante 60 segundos, para as concentrações de TMP de 0,1 µM, 0,3 µM e 0,7 µM

A partir da Tabela 4.3 é possível comparar os picos obtidos (para as concentrações 0,1 µM e 0,7 µM). As alturas dos picos foram muito semelhantes, não tendo muito influência o pré-tratamento utilizado na melhoria do pico final.

Tabela 4.3 Alturas dos picos, para a técnica DPV, para concentrações de TMP de 0,1 µM e 0,3µM – elétrodo sem tratamento – e 0,1 µM, 0,3 µM e 0,7 µM com pré-tratamento por amperometria 1 V durante 60 segundos numa solução de ácido sulfúrico.

Elétrodo	Altura do pico	Área do elétrodo	Altura/área
CP (0,1 µM)	$2,62 \times 10^{-05}$	0,595	$4,40 \times 10^{-05}$
CP (0,3 µM)	$3,07 \times 10^{-05}$	0,595	$5,16 \times 10^{-05}$
CP (H ₂ SO ₄ , 1 V, 60s, 0.1 µM)	$2,33 \times 10^{-05}$	0,595	$3,92 \times 10^{-05}$
CP (H ₂ SO ₄ , 1 V, 60s, 0.3 µM)	$3,08 \times 10^{-05}$	0,595	$5,18 \times 10^{-05}$
CP (H ₂ SO ₄ , 1 V, 60s, 0.7 µM)	$4,17 \times 10^{-05}$	0,595	$7,01 \times 10^{-05}$

Como referido anteriormente, os mesmos ensaios foram realizados, para as mesmas concentrações de fármaco e para o mesmo pré-tratamento, mas usando a técnica SWV.

Na Figura 4.8 estão apresentados os resultados para um elétrodo sem pré-tratamento para as diferentes concentrações de TMP. Verifica-se que com o aumento

da concentração de fármaco a altura do pico aumenta, sendo esta observação mais perceptível nas alturas dos picos determinadas (Tabela 4.4).

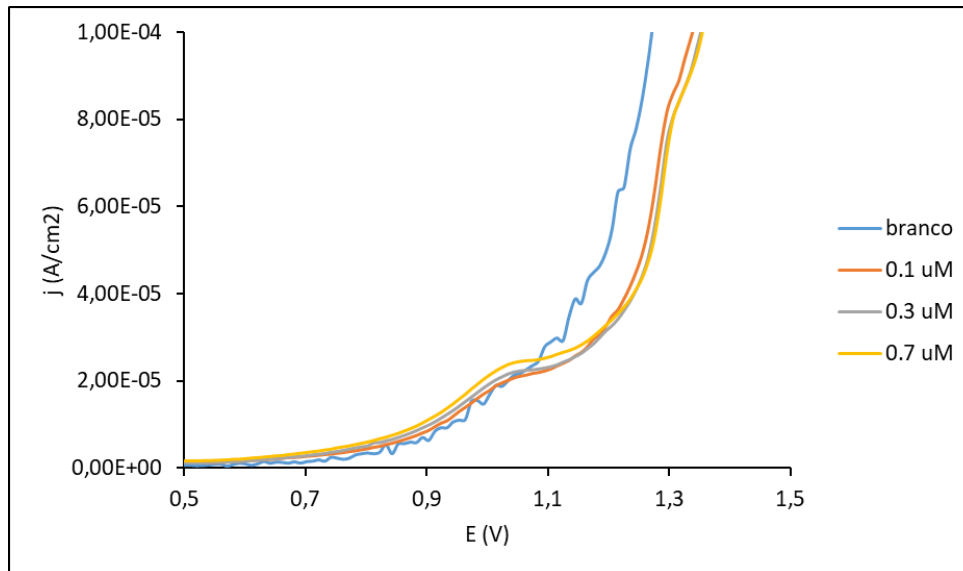


Figura 4.8 Resultados obtidos por SWV, com elétrodo sem pré-tratamento, para as concentrações de TMP de 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM

Na Figura 4.9 encontra-se a aplicação da técnica SWV usando o elétrodo pré-tratado com amperometria 1 V, 60 segundos. Verifica-se que os picos estão muito próximos uns dos outros, mas aumentam com o aumento da concentração do fármaco, tal como observado na Tabela 4.4.

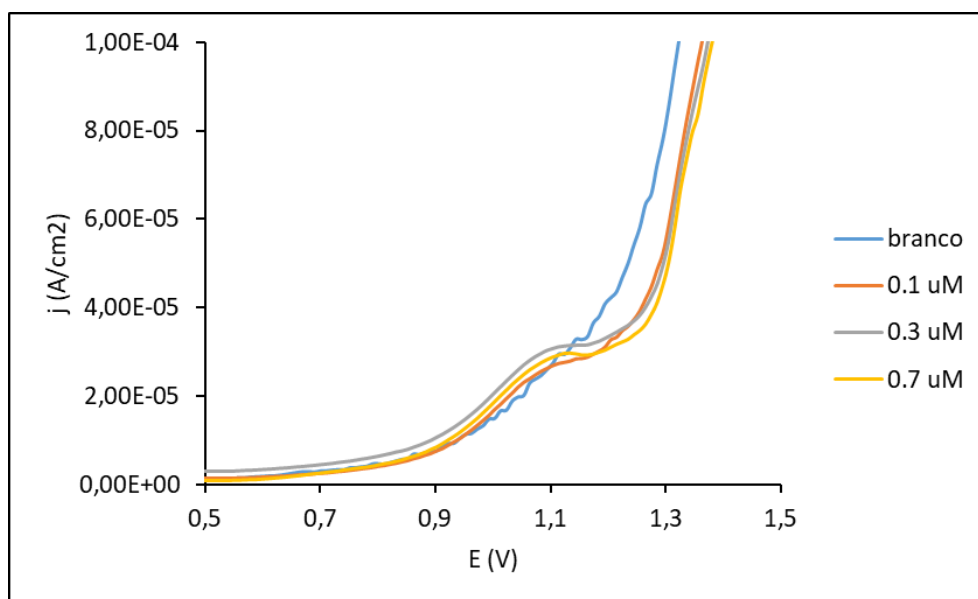


Figura 4.9 Resultados obtidos por SWV, com elétrodo com pré-tratamento uma solução de ácido sulfúrico, por amperometria a 1 V durante 60 segundos, para as concentrações de TMP de 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM

Observando a Tabela 4.4 podemos verificar que o pré-tratamento em ácido sulfúrico melhora determinação do TMP, apresentado intensidade de picos ligeiramente mais elevadas.

Tabela 4.4 Alturas dos picos, para a técnica SWV, para concentrações de TMP de 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM – elétrodo sem tratamento – e 0,1 μM , 0,3 μM e 0,7 μM com pré-tratamento por amperometria 1 V durante 60 segundos numa solução de ácido sulfúrico.

Elétrodo	Altura do pico	Área do elétrodo	Altura/área
CP (0,1 μM)	$1,66 \times 10^{-06}$	0,560	$2,96 \times 10^{-06}$
CP (0,3 μM)	$1,97 \times 10^{-06}$	0,560	$3,52 \times 10^{-06}$
CP (0,7 μM)	$2,28 \times 10^{-06}$	0,560	$4,07 \times 10^{-06}$
CP (H_2SO_4 , 1 V, 60 s, 0,1 μM)	$1,99 \times 10^{-06}$	0,560	$3,55 \times 10^{-06}$
CP (H_2SO_4 , 1 V, 60 s, 0,3 μM)	$3,11 \times 10^{-06}$	0,560	$5,55 \times 10^{-06}$
CP (H_2SO_4 , 1 V, 60 s, 0,7 μM)	$3,42 \times 10^{-06}$	0,560	$6,11 \times 10^{-06}$

A técnica SWV apresenta picos de oxidação de TMP mais definidos quando comparada com a técnica DPV, embora nesta última os valores absolutos sejam maiores. Sendo assim, a técnica SWV será usada nas caracterizações e otimizações futuras para a determinação do TMP.

4.2 Otimização das condições analíticas e determinação de trimetoprim

A técnica eletroquímica selecionada para a determinação de TMP foi de SWV, uma vez que, de todas as analisadas, foi a que apresentou melhor sensibilidade quando comparada com CV ou DPV.

Para se obter o melhor sinal possível para o TMP foram efetuadas diversas otimizações nomeadamente o pH da solução tampão BRB, os parâmetros da técnica SWV e a deposição de analito à superfície do eletrodo CP.

O pH da solução de análise é dos parâmetros que mais afeta o sinal dos sensores eletroquímicos. Especificamente para análise de TMP variou-se o pH da solução entre 3 e 12 estando os voltamogramas obtidos por SWV apresentados na Figura 4.10 a). Na Figura 4.10 b) pode observar-se a intensidade do pico em função do pH e na Figura 4.10 c) é possível observar o potencial do pico em função do pH.

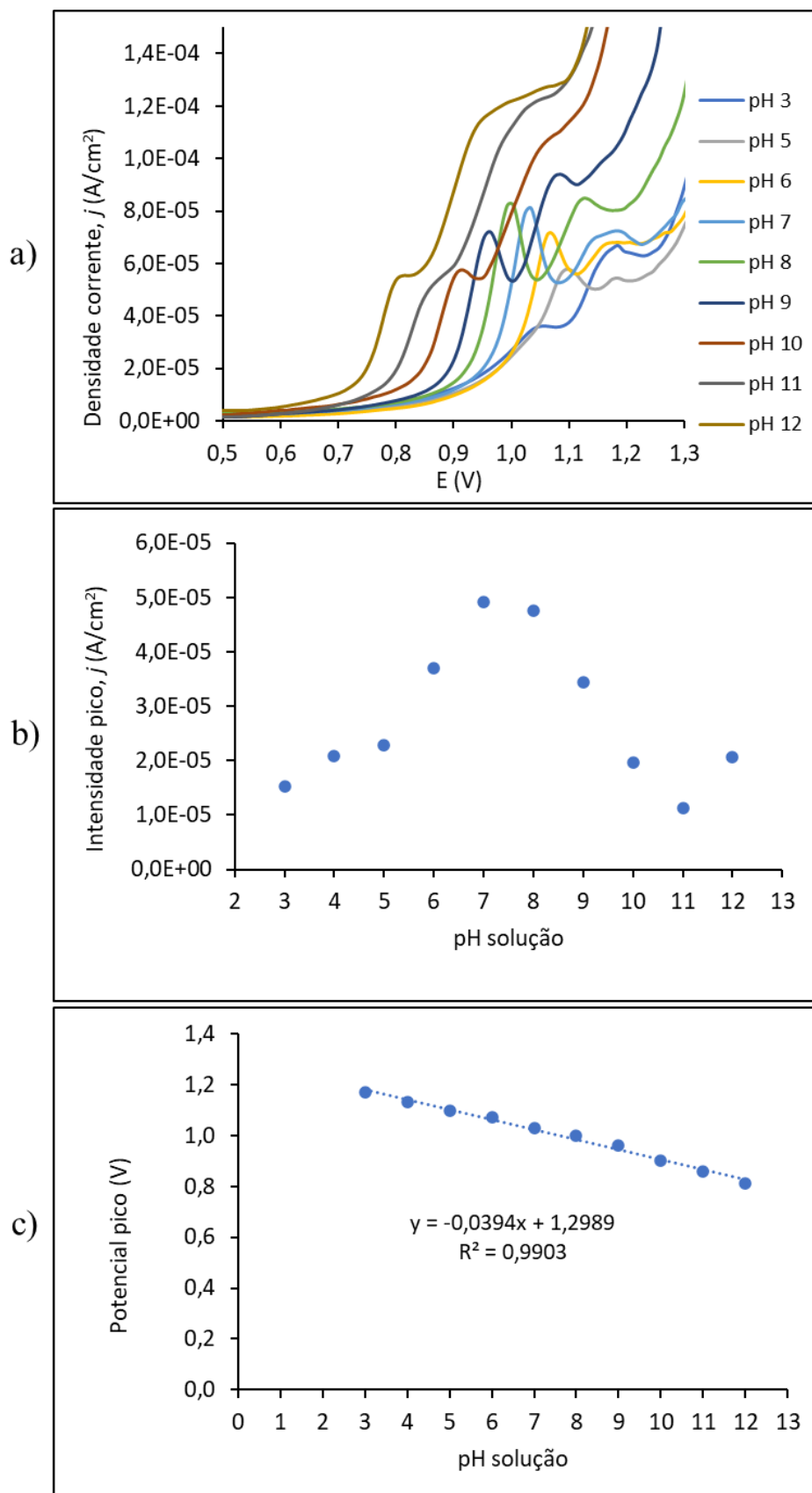


Figura 4.10 a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para otimização do pH. b) Intensidade da corrente em função do pH. As medições foram realizadas com 1,00 μ M de TMP. c) potencial do pico em função do pH.

Verifica-se que o pico de oxidação do TMP aumenta de intensidade com o aumento de pH até cerca de 7 invertendo depois a tendência (Figura 4.10 b) e o pico desloca-se para valores menos positivos de potencial com o aumento de pH (Figura 4.10 c). O pH 7 foi assim seleccionado como ótmo registando-se um potencial de pico de oxidação a cerca de 1 V.

Posteriormente à determinação do pH realizou-se a otimização dos restantes parâmetros da técnica SWV, em particular a determinação da amplitude, frequência e degrau de potencial.

Na Figura 4.11 é possível observar os resultados obtidos para a determinação da amplitude ótma, nomeadamente a intensidade do pico em função da amplitude.

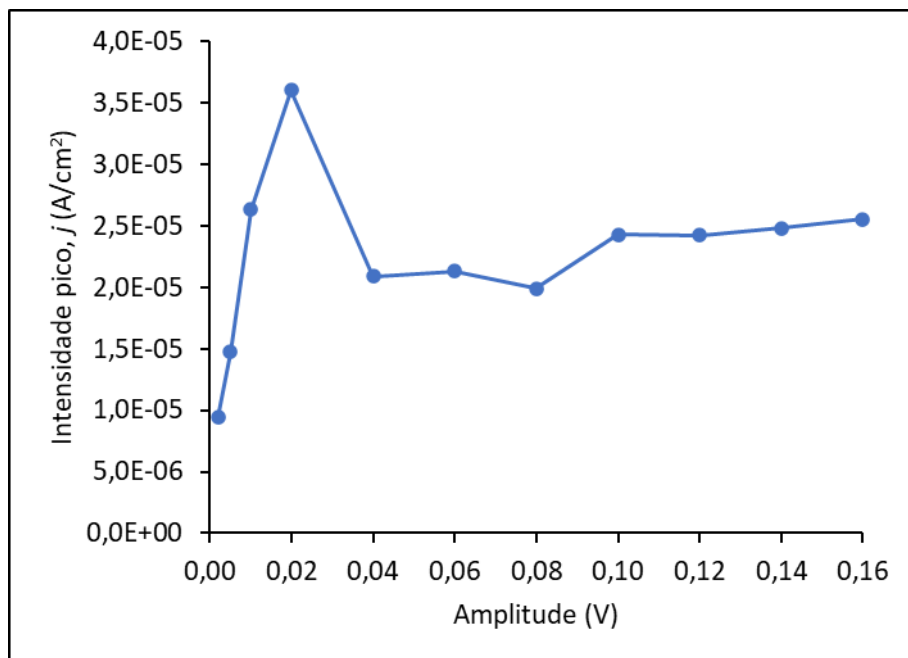


Figura 4.11 Intensidade da corrente (A/cm^2) em função da amplitude (V).

Verifica-se que a altura do pico é máxima a uma amplitude de 0,02 V, sendo que depois começa a decrescer, mantendo-se aproximadamente na mesma intensidade de pico independentemente da amplitude. Verifica-se também na Figura 4.11 que a linha de base aumenta para valores altos de amplitude o que leva a uma menor definição do pico. Assim o valor 0,02 V foi seleccionado como ótmo e usado nos seguintes ensaios.

Depois de determinado o valor ótmo de amplitude foi determinado o valor da frequência. Na Figura 4.12 observa-se a influência da variação da frequência na intensidade do pico.

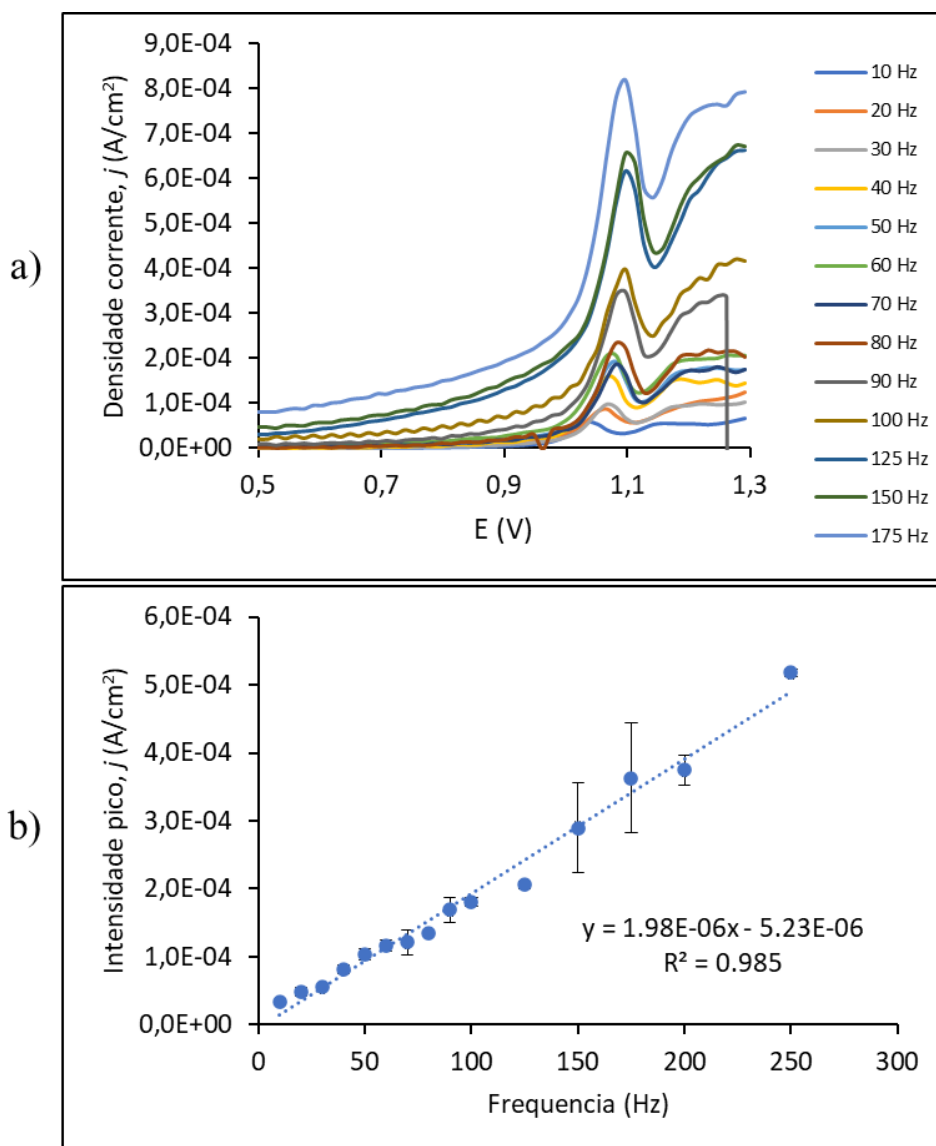


Figura 4.12 a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para otimização da frequência b) Densidade de corrente em função da frequência.

Ao contrário do observado na determinação dos valores ótimos de pH e amplitude, a intensidade do pico aumenta de forma linear com o aumento da frequência de acordo com a Figura 4.12 b). Para valores altos de frequência o sinal analítico torna-se também menos reprodutível.

A otimização do degrau de potencial demonstrou um comportamento semelhante ao comportamento da frequência no sentido em que intensidade do pico aumentou com o aumento do degrau de potencial tal como observado na Figura 4.13. A velocidade de

varrimento é dada pela multiplicação da frequência pelo degrau de potencial (*velocidade varrimento = frequência x degrau potencial*).

O aumento consecutivo da frequência e do degrau de potencial tornam os resultados menos reprodutíveis pelo que deve haver um compromisso entre os valores de degrau de potencial e de frequência selecionados.

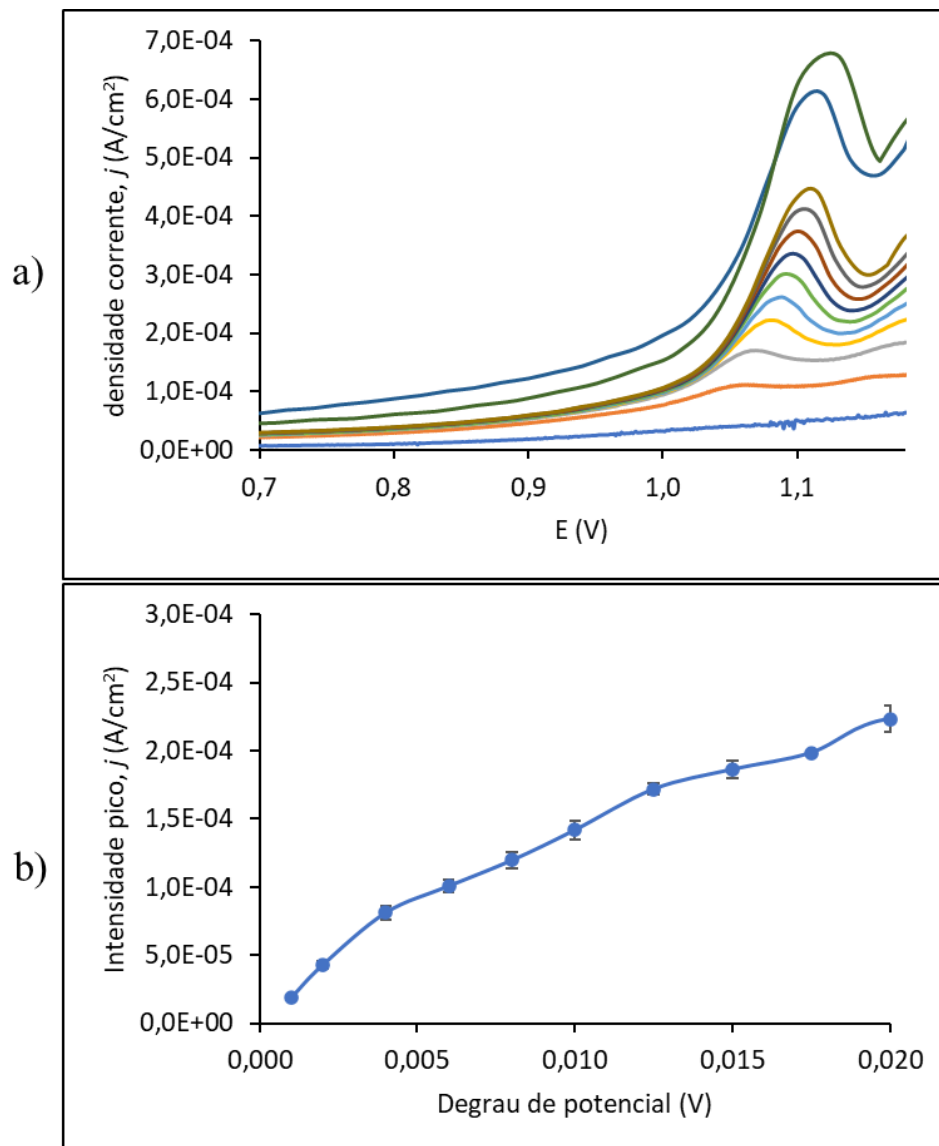


Figura 4.13 a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para otimização da amplitude b) Densidade de corrente em função do degrau de potencial.

Inicialmente foi selecionada uma frequência de 100 Hz (valores acima resultaram em um maior desvio tal como verificado na Figura 4.12 b)). De seguida, realizou-se a otimização do degrau de potencial, tendo sido selecionado um valor ótimo entre 0,008 V

e 0,01 V, traduzindo-se em velocidades de varrimento correspondentes a 800 mV/s e 1000 mV/s.

Contudo para estes valores observa-se uma maior ocorrência de ruído e os resultados tendem a ser menos reprodutíveis. Assim optou-se por reduzir a frequência para 50 Hz e aumentar o degrau de potencial para 0,015 V de forma a manter uma velocidade de varrimento equivalente (750 mV/s).

Depois de determinadas as condições ótimas para a determinação de TMP por SWV procedeu-se à otimização da deposição de analito. A deposição do analito, neste caso TMP, faz com que este pré-concentre à superfície do eléctrodo CP antes de se iniciar a análise por SWV, levando, conseqüentemente, ao aumento de sinal. Os fatores que afetam a deposição do analito são o potencial de deposição e o tempo de deposição.

Na Figura 4.14 são apresentados os resultados da intensidade do pico em função do potencial de deposição, comparando-se também com o voltamograma gerado sem qualquer deposição.

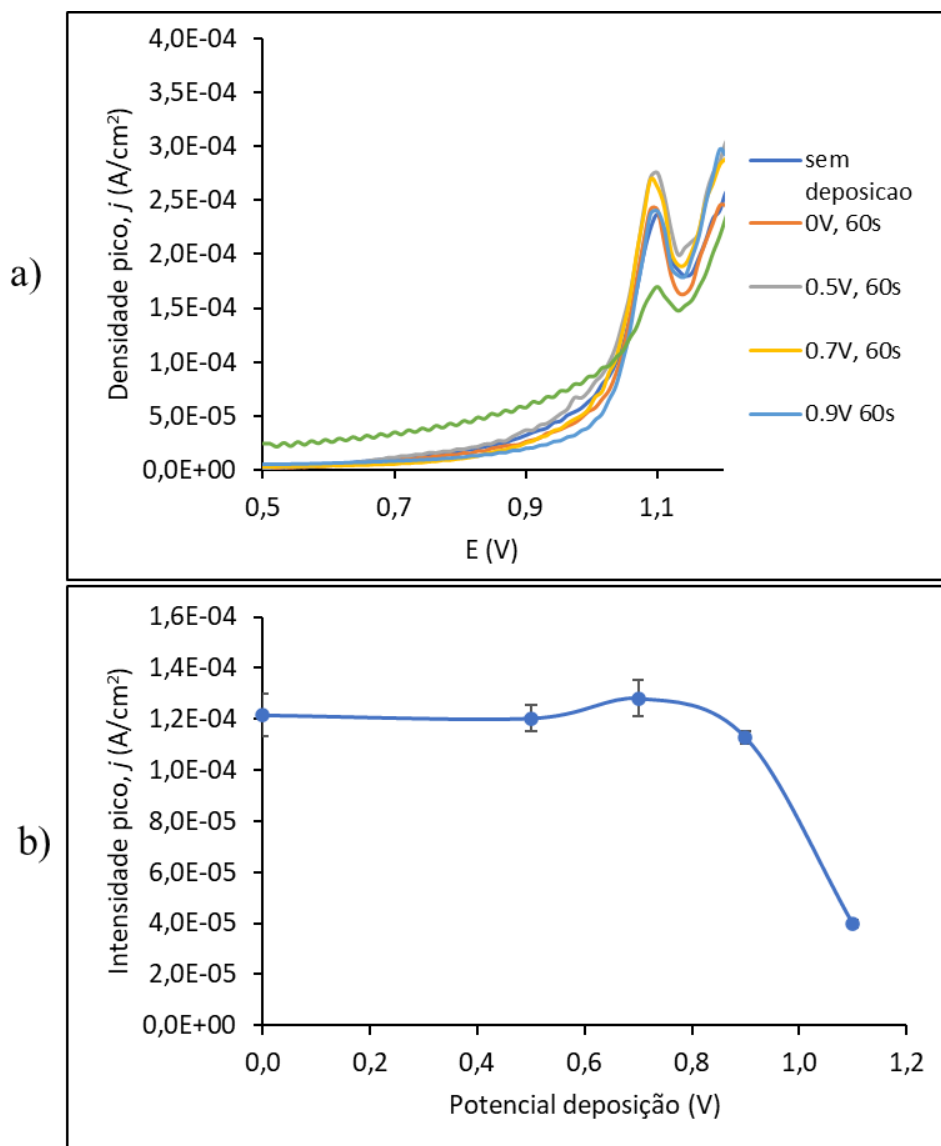


Figura 4.14 a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para otimização do potencial de deposição b) Densidade de corrente em função do potencial de deposição

Avaliando a deposição, o sinal analítico melhorou em cerca de 30% quando comparado com análise de TMP sem efetuar a deposição. Contudo não se verificou grandes diferenças entre os diferentes potenciais aplicados na deposição entre 0 e 0,9 V. Para 1,1 V a deposição ocorre a um potencial próximo do potencial de deteção do pico ocorrendo assim uma oxidação de TMP indesejada durante a pré-concentração levando a uma diminuição significativa do sinal. O potencial de deposição ótimo selecionado foi 0,7 V.

Posteriormente realizou-se os ensaios de otimização do tempo de deposição testando-se os tempos 0, 30, 50, 120 e 180 segundos, estando os resultados indicados Figura 4.15.

De acordo com os resultados da Figura 4.15 b) foi selecionado o tempo de 60 s como sendo o valor ótimo.

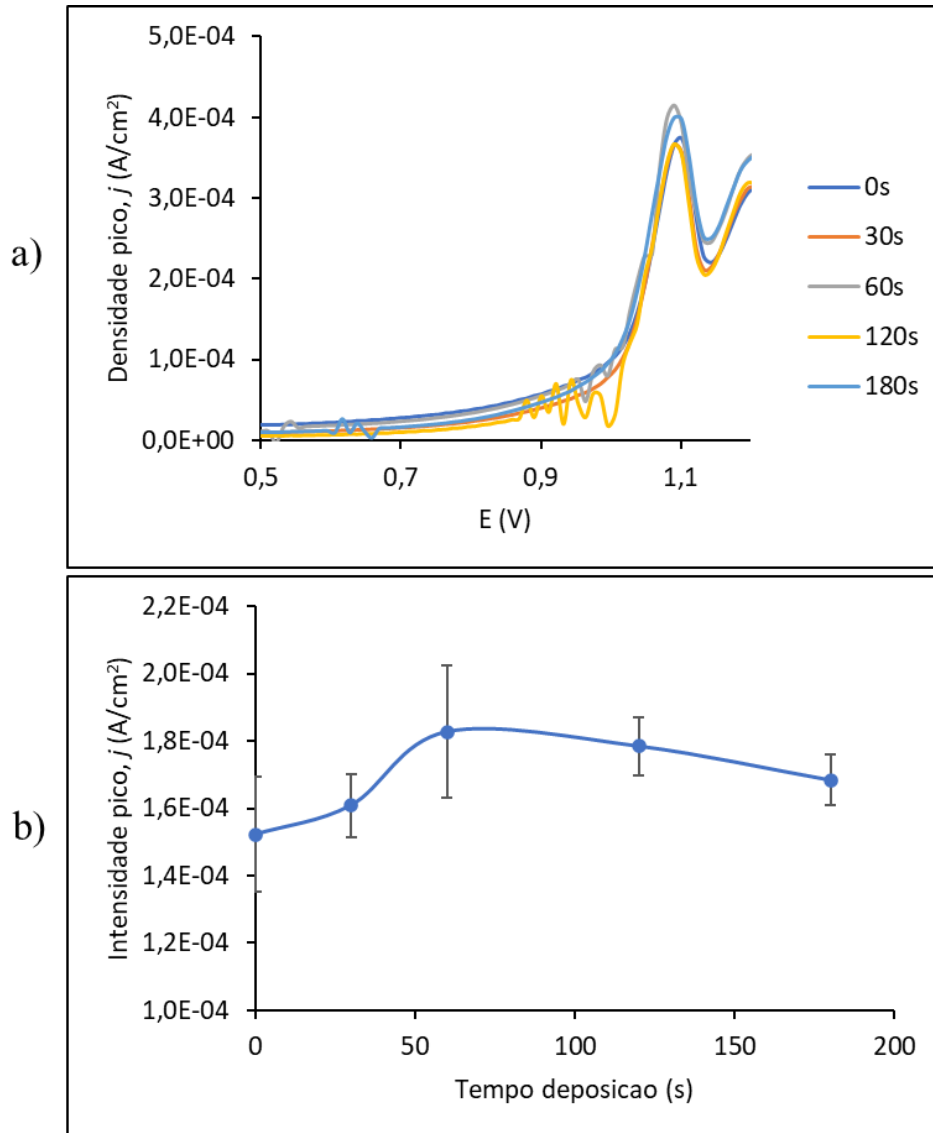


Figura 4.15 a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para otimização do tempo de deposição b) Densidade de corrente em função do tempo de deposição

Depois de realizado o processo de otimização das condições analíticas do TMP realizaram-se ensaios de determinação do fármaco a diferentes concentrações nas condições ótimas anteriormente referidas. Para este estudo foram adicionadas alíquotas de solução padrão de TMP analisando-se uma gama de concentrações entre 0,1 e 80 μ M sendo os resultados referente aos voltamogramas e respetivas curvas de calibração apresentados na Figura 4.16.

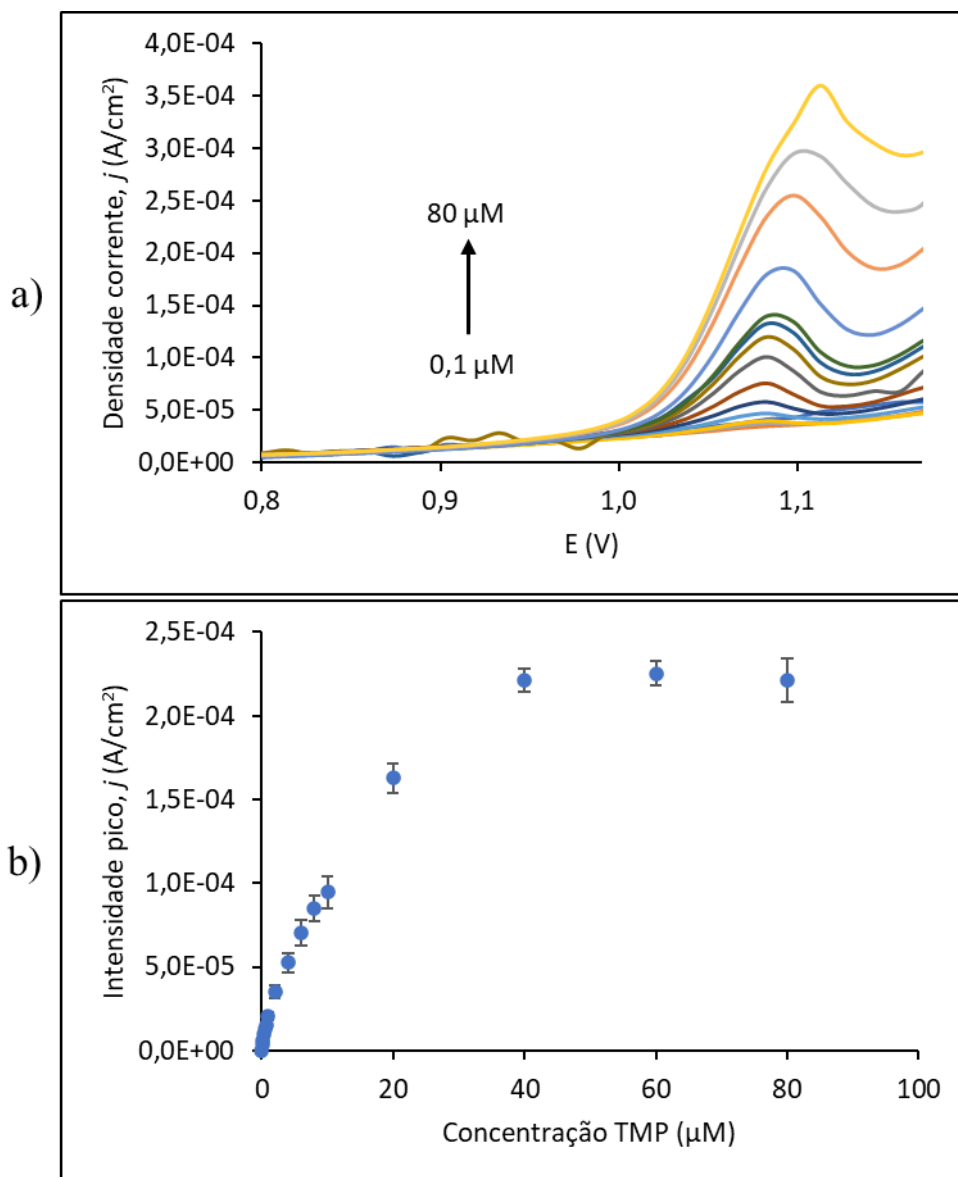


Figura 4.16 Determinação do trimetoprim por SWV em tampão nas condições ótimas (pH=7, amplitude = 0,02 V, frequência=50 Hz, degrau de potencial= 0,015 V; tempo de deposição = 60 s, potencial de deposição= 0,7 V. a) Voltamogramas obtidos na análise de concentrações crescentes de trimetoprim. b) Curva de calibração na gama de 0,1 μM– 80 μM de TMP.

Através da Figura 4.16 b) é possível observar que o pico do TMP aumenta até 40 μM, atingindo depois a saturação. Para esta gama de resultados podem verificar-se duas zonas de linearidade distintas, nomeadamente entre 0,1 e 1 μM (Figura 4.17 a)) e entre 2 e 20 μM (Figura 4.17 b)).

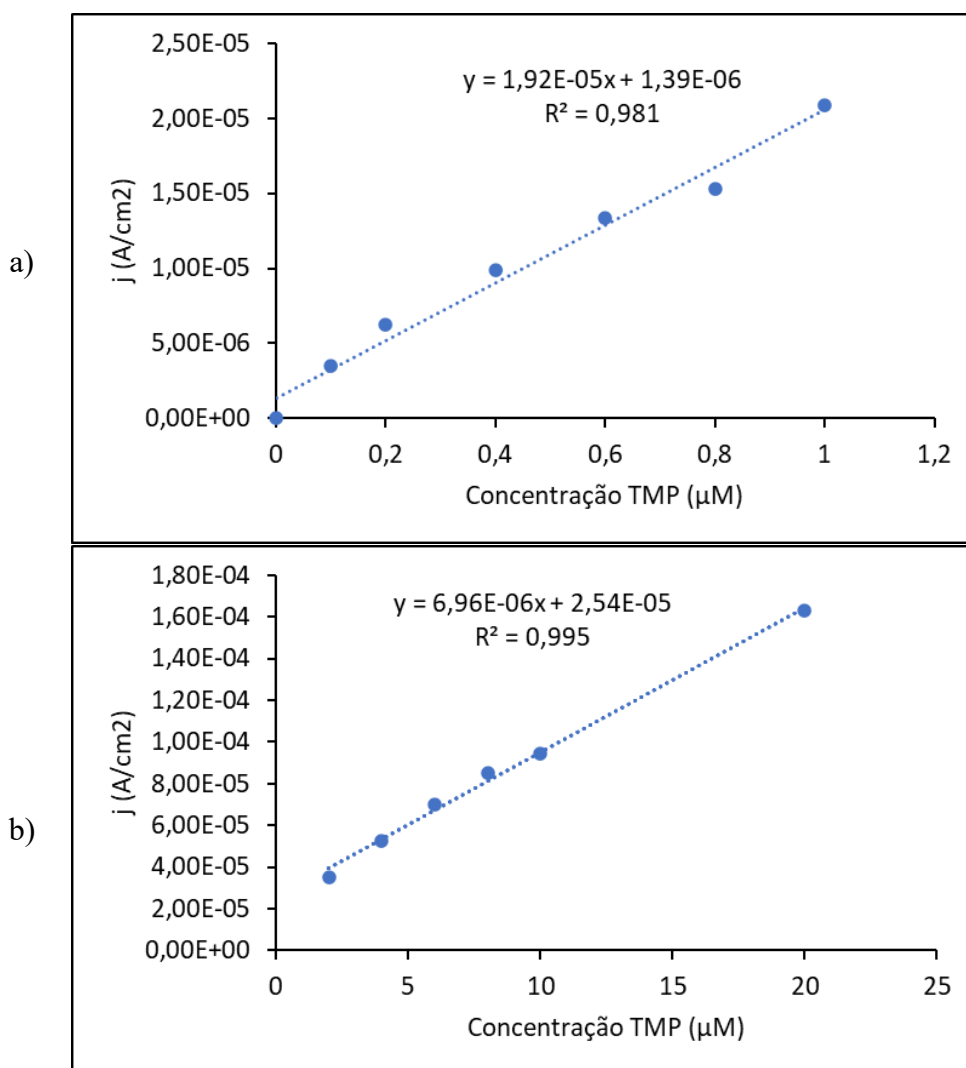


Figura 4.17 Curvas de calibração correspondentes às diferentes zonas de linearidade. a) 0,1 – 2,0 µM. b) 2,0 – 20 µM.

Através das curvas apresentadas acima pode-se verificar que é possível a determinação do TMP entre as concentrações 0,1 µM– 20 µM obtendo-se diferentes sensibilidades dependendo da zona linear. Para concentrações entre 0,1 µM e 1,0 µM a sensibilidade é $1,92 \times 10^{-5} \text{ A}/(\mu\text{M} \cdot \text{cm}^2)$, já para concentrações entre 2,0 µM e 20 µM a sensibilidade é menor e corresponde a $6,96 \times 10^{-6} \text{ A}/(\mu\text{M} \cdot \text{cm}^2)$.

A determinação do LOD e do limite de quantificação (LOQ) para cada zona foi efetuado com base no desvio padrão da resposta e o declive da reta de calibração tal como mostram as seguintes equações:

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{m} \quad (\text{Equação 4.1})$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{m} \quad (\text{Equação 4.2})$$

$$SD = S_{y/x} \times \frac{\sum x_i^2}{n \times \sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Equação 4.3})$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Com base na curva de calibração com menor gama de concentrações linear (Figura 4.17 a)) o LOD determinado correspondeu a $0,16 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ($n=3$) e o LOQ a $0,47 \pm 0,09 \mu\text{M}$. Em comparação com outros sensores descritos na literatura e apresentados na Tabela 1.1, em termos de LOD, verifica-se que este sensor CP consegue ser bastante competitivo em relação aos baseados em GCE [8],[14],[16], mesmo estando consideravelmente modificados com nanomateriais de carbono e metálicos. O mesmo se verifica quando comparado com os CPE [17],[18] sendo que estes envolvem procedimentos mais morosos na preparação da pasta de carbono.

Por fim procedeu-se à testagem do sensor CP em água de rio coletada logo próximo de uma ETAR de forma a validar o seu uso em amostras ambientais. Como pré-tratamento para a análise, a água foi simplesmente diluída 1:1 e fortificada com diferentes tomas de solução stock de TMP estando os resultados apresentados na Figura 4.18 e na Tabela 4.5.

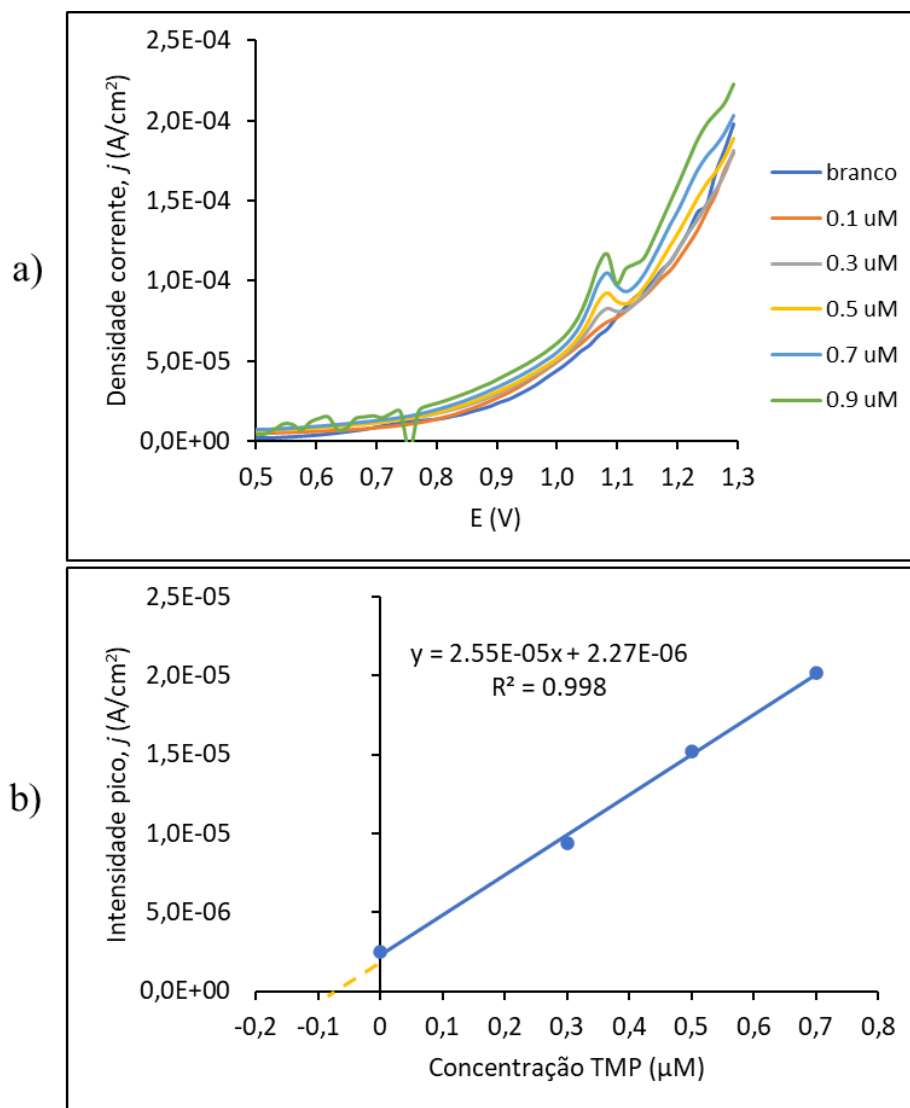


Figura 4.18 Voltamogramas obtidos por SWV na análise de uma amostra de água de rio (pH=7, amplitude= 0,02 V, frequência= 50 Hz, degrau de potencial = 0,015 V; tempo de deposição = 180 s; potencial de deposição = 0,7 V). b) Curva de calibração através do método de adição padrão.

Resultados preliminares demonstraram que é viável a aplicação do sensor CP em amostras de água de rio obtendo-se uma recuperação de 89% através do método de adição padrão (Figura 4.18). Uma vez que a zona da colheita se situava perto de uma descarga de efluentes de estação de tratamento de águas residuais, uma simples filtração prévia da amostra poderá ser importante para melhorar a percentagem de recuperação.

Conclusões

O consumo crescente de fármacos, bem como o seu descarte para o ambiente têm levado a alterações no meio biótico e abiótico que podem ser adversas à saúde humana. De entre os fármacos já detetados no meio ambiente é importante realçar os antibióticos, grupo onde se insere a trimetoprim, que foi o foco deste trabalho. A crescente contaminação no meio ambiente leva a que as bactérias criem resistência a estes fármacos colocando em causa a eficácia dos tratamentos já desenvolvidos para o combate a estes microrganismos.

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um sensor eletroquímico de CP capaz de detetar o TMP em amostras ambientais. Este tipo de deteção apresenta elevadas vantagens quando comparadas com métodos tradicionais como a cromatografia líquida uma vez que é mais rápida, mais sensível, mais barata e com consumo menor de reagentes.

Para a determinação de TMP foram estudados diferentes técnicas e pré-tratamentos do elétrodo para se avaliar qual a forma mais eficaz e sensível de determinação do teor de TMP. Inicialmente foram realizados pré-tratamentos no elétrodo, nomeadamente pré-tratamento com H_2SO_4 e NaOH, não se tendo registado nenhuma melhoria do sinal. Posteriormente, foram avaliados os picos recorrendo a diferentes técnicas, CV, DPV e SWV, tendo sido a última a que apresentou melhores resultados. Após selecionada a técnica, foram otimizadas as condições de determinação de TMP, tendo obtido os seguintes valores ótimos: pH 7, amplitude 0,02 V, frequência 50 Hz e degrau de potencial 0,015 V. O tempo e potencial ótimos de deposição foram iguais a 60 s e 0,7 V, respetivamente. Após determinação das condições ótimas, avaliou-se a linearidade na gama de 0,1 μM a 80 μM , tendo-se atingido a saturação após os 40 μM . O LOD da técnica foi de $0,16 \pm 0,03 \mu M$ ($n=3$) e o LOQ $0,47 \pm 0,09 \mu M$. Avaliando o desempenho deste sensor e comparando-o com outros descritos na literatura, obteve-se valor de LOD e LOQ semelhantes, sendo que no geral não é necessário recorrer à modificação do elétrodo, através da incorporação de nanomateriais de carbono ou metálicos.

A posterior validação do sensor numa amostra de rio permitiu concluir que o sensor desenvolvido tem aplicação para a determinação do fármaco em amostras ambientais. O trabalho experimental continuará de forma a proceder-se a uma melhor validação do sensor e obter-se melhores recuperações, próximo de 100%. Este sensor de CP apresenta

assim um grande potencial na determinação de contaminantes devido à suas propriedades, simplicidade e eficiência.

Bibliografia

- [1] Montagner, C. C., Vidal, C., & Acayaba, R. D. (2017). Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Química Nova*. Sociedade Brasileira de Química. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>
- [2] Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*. Volume 3, Issue 1, Pages 1-16, ISSN 2405-6650
- [3] Montone, R. C. (2015, maio). Bioacumulação e Biomagnificação. Universidade de São Paulo, instituto oceanográfico. <https://www.io.usp.br/index.php/oceanos/textos/antartida/31-portugues/publicacoes/series-divulgacao/poluicao/811-bioacumulacao-e-biomagnificacao>
- [4] Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M. R., & Espindola, E. L. G. (2008). A toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de Avaliação, *Química Nova*, Volume 31, Issue. 7, Pages 1820-1830
- [5] Miller, T. H., Bury, N. R., Owen, S. F., MacRae, J. I., & Barron, L. P. (2018). A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environmental Pollution*. Volume 239, Pages 129-146, ISSN 0269-7491
- [6] Mpatani, Aaron Albert Aryee, Alexander Nti Kani, Runping Han, Zhaohui Li, Evans Dovi, Lingbo Qu. (2021) A review of treatment techniques applied for selective removal of emerging pollutant-trimethoprim from aqueous systems, *Journal of Cleaner Production*, Volume 308, 127359, ISSN 0959-6526
- [7] González T., Joaquín R. Domínguez J. R., Palo P. (2011). Development and optimization of the BDD-electrochemical oxidation of the antibiotic trimethoprim in aqueous solution, *Desalination*, Volume 280, Issues 1–3, Pages 197-202, ISSN 0011-9164,
- [8] Yue X., Li Z., Zhao S. (2020) A new electrochemical sensor for simultaneous detection of sulfamethoxazole and trimethoprim antibiotics based on graphene and ZnO nanorods modified glassy carbon electrode, *Microchemical Journal*, Volume 159, 105440, ISSN 0026-265X

- [9] Huovinen P. (1995) Trimethoprim Resistance, A Mini Review, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Volume 39, Pages 279-289
- [10] Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), Pages 197–206.
- [11] Lowinsohn, D., & Bertotti, M. (2006). Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Química Nova*, 29(6), Pages 1318–1325.
- [12] CADENCE PCB SOLUTIONS. (2020). Differential Pulse Voltammetry Explained. Obtido de PCB SOLUTIONS: <https://resources.pcb.cadence.com/blog/2021-differential-pulse-voltammetry-explained>
- [13] Djenaine de Souza, S. A. (2002). Voltametria de onda quadrada, Primeira Parte: Aspectos teóricos. Obtido de <https://www.scielo.br/j/qn/a/Q3FVK6y8Mm7wnzF6HkykBGg/?format=pdf&lang=pt>
- [14] Thais T. Guaraldoa, L. A. (2019). Carbon black nanospheres modified with Cu (II)-phthalocyanine for electrochemical determination of Trimethoprim antibiotic, *Applied Surface Science*, Volume 470, 2019, Pages 555-564, ISSN 0169-4332
- [15] T. Bhengo, M. M. (2019). Simultaneous oxidative determination of antibacterial drugs in aqueous solutions using an electrode modified with MWCNTs decorated with Fe₃O₄ nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, Volume 42, Issue 7, Pages 5014-5023
- [16] Diego L.C. Golinelli, S. A. (2017). Synthesis of Silver Nanoparticle-Graphene Composites for Electroanalysis Applications using Chemical and Electrochemical Methods. *Electroanalysis*, Volume 29, Issue 4, Pages 1014-1021
- [17] Ramya Kumari, G. P. (2016). Voltammetric Studies of Trimethoprim at Sodium Dodecyl Sulphate Modified Carbon Paste Electrode. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, Volume 5, Issue 5, Pages 142-148
- [18] Ramya Kumari, G. M. (2016,). Voltammetric Detection of Trimethoprim at CTAB Modified Carbon Paste Electrode. *Chemical Science Transactions*, Volume 5, Issue 3, Pages 619-626
- [19] Ivana Cesarino, V. C. (2013). Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of

- sulfamethoxazole and trimethoprim, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 188, Pages 1293-1299, ISSN 0925-4005
- [20] Livia F. Sgobbi, C. A. (2016). A disposable electrochemical sensor for simultaneous detection of sulfamethoxazole and trimethoprim antibiotics in urine based on multiwalled nanotubes decorated with Prussian blue nanocubes modified screen-printed electrode. *Electrochimica Acta*, Volume 191, Pages 1010-1017, ISSN 0013-4686
- [21] Leonardo S. Andrade, R. C.-F.-F. (2009). Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim on a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* Volume 21, Issue 13, Pages 1475-1480
- [22] Leonardo S. Andrade, M. C.-F.-F. (2009). A multidimensional high performance liquid chromatography method electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk. *Analytica Chimica Acta*, Volume 654, Issue 2, Pages 127–132
- [23] Helena M. Carapuça, D. J. (2005). Adsorptive stripping voltammetry of trimethoprim: Mechanistic studies and application to the fast determination in pharmaceutical suspensions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 38, Issue 2, Pages 364-369, ISSN 0731-7085
- [24] Mohammad F. Khanfar1, Eyad S. M. Abu-Nameh, Munib M. Saket, Lujain T. Al Khateeb, Akram Al Ahmad, Zeinab Asaad, Zaina Salem, and Nasim Alnuman (2019). Detection of Hydrochlorothiazide, Sulfamethoxazole, and Trimethoprim at Metal Oxide Modified Glassy Carbon Electrodes *International Journal of Electrochemical Science*, Volume 15, Issue 2, Pages 1771-1787
- [25] Polyana Fernandes Pereira, Weberson Pereira da Silva, Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, Eduardo Mathias Richter, (2016). A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* Volume 766, Pages 87-93, ISSN 1572-6657
- [26] Mahmoud Aboudan, Yousry M. Issa, Adel F. Shoukry, Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, Eduardo Mathias Richter, (1994). New plastic membrane ion-selective electrode for determination of trimethoprim. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Volume 61, Issue 1, Pages 31-35

