

MESTRADO EM TECNOLOGIAS DE PROTECÇÃO AMBIENTAL

**“Desenvolvimento de métodos rápidos para deteção de
drogas no meio aquático”**

Helena Gomes, nº 1040841

Ano Letivo 2011/2012

Mestrado em Engenharia Química: Tecnologias
de Proteção Ambiental

***Desenvolvimento de métodos rápidos para
deteção de drogas no meio aquático***

Helena Gomes, 1040841@isep.ipp.pt



Departamento de Engenharia Química

Orientador: Maria Goreti Ferreira Sales

Agradecimentos

À Dra. Goreti Sales, pela dedicação, profissionalismo e pela forma como orientou este trabalho.

À Felismina Moreira, que esteve sempre disponível para ajudar nas dúvidas que foram surgindo e pelas opiniões dadas.

Aos meus colegas de trabalho no BioMark, Sensor Research, nomeadamente à Liliana Truta, Tânia Rebelo, Isabel Mouta e Gustavo Cabral que também se disponibilizaram para ajudar quando era preciso.

Ao Engenheiro Crispim, pela sua flexibilidade em aceitar este projeto como tese de Mestrado.

À minha família, ao meu namorado e aos meus amigos por me ajudarem a completar esta caminhada, pela paciência, pela compreensão e pelo apoio incondicional.

Resumo

A vasta aplicação de antibióticos em sistemas de aquacultura tem conduzido ao aparecimento de espécies microbianas resistentes, devendo ser evitada ou, se possível, minimizada. A minimização implica um controlo muito rigoroso das doses aplicadas, algo que só pode ser realizado se todo o processo analítico for simples, barato e puder ser implementado no local.

O presente trabalho descreve para este efeito um sistema sensor constituído por papel quimicamente modificado, cujo procedimento analítico foi semelhante à monitorização de pH através das conhecidas tiras indicadoras de pH universal. O papel foi modificado com base em reacções de monocamadas e assumiu uma coloração típica após contacto com o antibiótico. A intensidade da coloração estava também relacionada com a concentração desse antibiótico. Como prova deste conceito, o sensor proposto foi desenhado tendo em vista a monitorização de oxitetraciclina, um dos antibióticos utilizados neste contexto com elevada frequência.

A modificação do papel foi baseada na alteração química das unidades de glucose na matriz sólida por reacção covalente com reagentes apropriados. Foram utilizadas duas estratégias diferentes para este efeito: uma foi baseada em reacções de tipo sol-gel e a outra em reacção de adição nucleófila. Posteriormente, o papel foi modificado com espécies metálicas capazes de mudar de cor na presença da oxitetraciclina. Estas modificações químicas foram avaliadas e optimizadas relativamente a vários parâmetros, no sentido de promover uma variação de cor intensa face à concentração de antibiótico. Procedeu-se ainda ao controlo desta modificação por técnicas de espectroscopia de infravermelho. A variação de cor foi avaliada por comparação visual, mas registada por imagem digital.

Os materiais sensores preparados foram ainda caracterizados do ponto de vista do seu desempenho analítico. Incluíram-se aqui a identificação de uma relação linear entre coordenadas de cor e concentração, a atribuição de uma gama de concentrações capaz de fornecer uma resposta previsível e resposta cruzada face a outros antibióticos. Procedeu-se ainda à aplicação dos sensores numa amostra de água ambiental dopada com antibiótico. De uma forma geral, foi possível estabelecer um processo simples de modificação de papel capaz de aferir a presença e a quantidade de tetraciclina, mais concretamente a oxitetraciclina. O processo aqui estabelecido é promissor, antevendo a concretização de uma metodologia simples, barata e local para a monitorização de antibióticos em águas.

Palavras-Chave: Sensor, Papel, Antibiótico, Água, Ambiente, Aquacultura.

Abstract

The wide use of antibiotics in aquaculture has led to the emergence of resistant microbial species. It should be avoided or else minimized. This minimization requires a rigorous control of the amount of drug applied, which can be only done by means of a simple, inexpensive and on-site analytical process.

For this purpose, the present work describes a sensory system made with chemically modified paper, based in an analytical procedure that was close to pH monitoring by universal pH paper. The cellulose paper was modified by self-assembling monolayer technique, gaining a typical colour after contacting with the antibiotic. The colour intensity was also linked to its concentration. As prove of concept, this new concept was applied to oxytetracycline, one of the antibiotics used frequently in aquaculture activities.

The paper modification was based on the chemical change of the glucose units among the paper material by covalent bonding to specific reagents. Two different approaches were taken for this purpose: one used sol-gel based reactions while the other relied on a nucleophilic addition mechanism. The paper was after modified with metallic species ensuring a colour change after contacting with oxytetracycline. These chemical changes were evaluated and optimized in order to provide an intense colour change against the concentration of antibiotic. These changes were also followed by infrared spectroscopy. The colour changes were evaluated by visual comparison and also recorded by a digital camera.

The sensory materials prepared were also characterized with regard to their analytical features, namely the identification of the colour coordinates providing a linear correlation to concentration, the linear concentration range and the cross-response against other antibiotics. These materials were also applied to the analysis of a spiked environmental water.

In general, this work provided a simple way to paper modification, capable of identifying and quantifying tetracycline drugs, more precisely oxytetracycline. This was a promising process for local, quick and cheap monitoring of antibiotic drugs.

Key-words:

Sensor, Paper, Antibiotic, Water, Environment, Aquaculture

Índice Geral

1. Introdução	1
1.1. Aquacultura	1
1.2. Compostos presentes em aquacultura.....	2
Tetraciclinas.....	4
1.3. Métodos Analíticos para Tetraciclinas	5
Técnicas Microbiológicas	5
Técnicas Separativas.....	6
Técnicas Eletroanalíticas	6
Técnicas Óticas	7
1.4. Modelos de cores	7
1.5. Considerações Gerais	8
2. Descrição Experimental.....	11
2.1. Material, equipamentos e reagentes	11
2.2. Procedimentos para formação de complexos em meio aquoso.....	11
2.3. Procedimentos de modificação do papel.....	12
2.4. Otimização do papel sensor modificado por APTES (10%) em etanol	16
2.4.1. Ponto de viragem	17
2.4.2. Concentração APTES.....	17
2.4.3. Concentração da espécie metálica	17
2.4.4. Tempo de reação de APTES	17
2.5. Seletividade relativamente a outros antibióticos	17
2.6. Aplicação do sensor numa amostra ambiental	18
3. Resultados e discussão	19
3.1. Seleção de espécies metálicas	19
3.2. Modificação química do papel	21
3.3. Otimização do sensor.....	25
3.3.1. Ponto de viragem	25

3.3.2.	Concentração de APTES.....	27
3.3.3.	Concentração da espécie metálica.....	29
3.3.4.	Tempo de reação do APTES.....	30
3.4.	Controlo da modificação do papel.....	32
3.5.	Parâmetros gerais de calibração do sensor.....	36
3.6.	Sensibilidade a outros antibióticos.....	39
3.7.	Aplicabilidade na análise de amostras ambientais.....	40
4.	Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro.....	43
5.	Referências bibliográficas.....	45
Anexo A	49
Anexo B	55
Anexo C	71

Índice de Figuras

Figura 1. 1- Sistemas de aquacultura diversos, extraídos em [5]	2
Figura 1. 2- Estrutura química da tetraciclina.....	5
Figura 1. 3- Tonalidade, Luminosidade e Saturação [28].....	8
Figura 3. 1- Evolução de cores dos sensores APTES/etanol/ Cu^{2+} (A) e APTES/etanol/ Cu^{2+} / oxitetraciclina (B), a cada 2 minutos (até 30 minutos) de reação com APTES.....	32
Figura 3. 2- Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel e do papel modificado obtido, relativos ao estudo do tempo da reação de APTES (tempo = 30 minutos).....	33
Figura 3. 3- Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel e do papel modificado obtido, com destaque para a ligação de Cu^{2+} (30 minutos para APTES).	34
Figura 3. 4- Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel e do papel modificado obtido, com destaque para a ligação de Fe^{3+} (30 minutos para APTES).	35
Figura 3. 5- Curva de Calibração do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+}	37
Figura 3. 6- Curva de calibração do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+}	38
Figura B. 1- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 30 minutos (espécie metálica Cu^{2+}).....	56
Figura B. 2- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 30 minutos (espécie metálica Fe^{3+}).....	57
Figura B. 3- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 1 hora. Visualização da ligação do Cu^{2+} ao APTES 10% em etanol.	58
Figura B. 4- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 1 hora (espécie metálica Cu^{2+}).....	59
Figura B. 5- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 1 hora. Visualização da ligação do Fe^{3+} ao APTES 10% em etanol.....	60
Figura B. 6- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 1 hora (espécie metálica Fe^{3+})	61

Figura B. 7- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 2 horas. Visualização da ligação do Cu^{2+} ao APTES 10% em etanol.	62
Figura B. 8- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 2 horas (espécie metálica Cu^{2+})	63
Figura B. 9- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 2 horas. Visualização da ligação do Fe^{3+} ao APTES 10% em etanol.....	64
Figura B. 10- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 2 horas (espécie metálica Fe^{3+})	65
Figura B. 11- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 3 horas. Visualização da ligação do Cu^{2+} ao APTES 10% em etanol.	66
Figura B. 12- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 3 horas (espécie metálica Cu^{2+})	67
Figura B. 13- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 3 horas. Visualização da ligação do Fe^{3+} ao APTES 10% em etanol.....	68
Figura B. 14- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 3 horas (espécie metálica Fe^{3+})	69
Figura C. 1- Curva de Calibração do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} para as imagens obtidas por digitalização.	74
Figura C. 2- Curva de Calibração do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} para as imagens obtidas por digitalização.	76

Índice de Tabelas

Tabela 1. 1- Exemplos de alguns compostos utilizados em aquacultura e potenciais riscos, numa tabela extraída de [10].	3
Tabela 1. 2- Exemplos de aparecimento de estirpes microbianas resistentes estes antibióticos, numa tabela extraída de [11].	4
Tabela 2. 1- Preparação do papel sensor APTES/etanol (: contém; : não contém).	13
Tabela 2. 2- Preparação do papel sensor APTES/HEPES (: contém; : não contém).	14
Tabela 2. 3- Preparação do papel sensor GLUT/Etanol (: contém; : não contém).	15
Tabela 2. 4- Preparação do papel sensor GLUT/H ₂ O (: contém; : não contém).	16
Tabela 3. 1- Cores das soluções das espécies metálicas, antes e depois da adição de OXI.	20
Tabela 3. 2- Cores do sensor APTES/etanol após as subseqüentes modificações químicas e o contacto com OXI a duas concentrações diferentes.	23
Tabela 3. 3- Cores do sensor APTES/HEPES após as subseqüentes modificações químicas e o contacto com OXI a duas concentrações diferentes.	23
Tabela 3. 4- Cores do sensor GLUT/etanol após as subseqüentes modificações químicas e o contacto com OXI a duas concentrações diferentes.	24
Tabela 3. 5- Cores do sensor GLUT/H ₂ O após as subseqüentes modificações químicas e o contacto com OXI a duas concentrações diferentes.	24
Tabela 3. 6- Evolução da cor do sensor APTES/etanol com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo.	25
Tabela 3. 7- Evolução da cor do sensor APTES/etanol/Cu ²⁺ com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo.	26
Tabela 3. 8- Evolução da cor do sensor APTES/etanol/Fe ³⁺ com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo.	27
Tabela 3. 9- Cores do sensor APTES/etanol/Cu ²⁺ preparado com diferentes concentrações de APTES.	28
Tabela 3. 10- Cores do sensor APTES/etanol/Fe ³⁺ preparado com diferentes concentrações de APTES.	28
Tabela 3. 11- Evolução de cores do sensor APTES/etanol/Cu ²⁺ com diferentes concentrações de Cu ²⁺ .	29

Tabela 3. 12- Evolução de cores do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} com diferentes concentrações de Fe^{3+}	30
Tabela 3. 13- Evolução de cores do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} com diferentes tempos de reação com APTES.....	31
Tabela 3. 14- Evolução de cores do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} com diferentes tempos de reação com APTES.....	31
Tabela 3. 15- Coordenadas de cor das imagens dos sensores APTES/etanol/ Cu^{2+} em diferentes concentrações de OXI, obtidas por fotografia.	37
Tabela 3. 16- Coordenadas de cor das imagens dos sensores APTES/etanol/ Cu^{2+} em diferentes concentrações de OXI, obtidas por fotografia.	38
Tabela 3. 17-Resposta do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} a outros antibióticos.....	39
Tabela 3. 18-Resposta do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} a outros antibióticos.	39
Tabela 3. 19- Resposta dos sensores à presença de OXI numa amostra ambiental real.	40
Tabela 3. 20-Valores das coordenadas de cor relativas à amostra ambiental.	41
Tabela A. 1- Procedimento experimental e resultados observados com o sensor APTES/etanol.	50
Tabela A. 2- Procedimento experimental e resultados observados com o sensor APTES/HEPES.....	51
Tabela A. 3- Procedimento experimental e resultados observados com o sensor GLUT/Etanol.....	52
Tabela A. 4- Procedimento experimental e resultados observados com o sensor GLUT/ H_2O	53
Tabela C. 1- Evolução da cor do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo, através de imagem obtida por digitalização. .	72
Tabela C. 2- Coordenadas de cor dos sensores APTES/etanol/ Cu^{2+} em diferentes concentrações de OXI, obtidas a partir de imagens obtidas por digitalização.	73
Tabela C. 3- Evolução da cor do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo, através de imagem obtida por digitalização. .	74
Tabela C. 4- Coordenadas de cor dos sensores APTES/etanol/ Fe^{3+} em diferentes concentrações de OXI, obtidas a partir de imagens obtidas por digitalização.	75

Lista de Abreviaturas

OXI	Oxitetraciclina
RNA	Ácido ribonucleico
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)1-piperazinil]etanosulfónico
APTES	3-aminopropil-trietoxisilano
GLUT	Gluteraldeido
BDH	Sulfato de alumínio 16-hidratado

1. Introdução

1.1. Aquacultura

O crescimento da população humana e as alterações dos seus hábitos alimentares têm levado ao aumento regular do consumo de peixe. Esta realidade tem conduzido à diminuição das populações selvagens de pescado, surgindo assim a necessidade de encontrar medidas económicas e ambientais viáveis alternativas [1]. É neste contexto que a aquacultura surge e assume cada vez mais um papel socioeconómico importante, visando assegurar o aumento da produção de peixe através de práticas como a alimentação artificial, a proteção contra predadores, integração com outras espécies ou controlo populacional e a manutenção de espécies em risco de extinção [2,3].

A aquacultura pode ser definida como a produção em cativeiro de animais (peixes, moluscos, crustáceos, répteis, batráquios, equinodermes) ou plantas que tenham um *habitat* predominantemente aquático, em pelo menos uma fase da sua vida [1]. Está implícita a intervenção humana nesta atividade, incluindo-se aqui as diversas formas de propagação, de manutenção e de colheita de espécies, em ambientes mais ou menos controlados. As principais áreas de aquacultura são classificadas segundo o tipo de organismos produzidos (crustáceos; algas; moluscos; ou peixes), segundo o ambiente de cultura (marinho; água doce; ou salobra), ou segundo a temperatura (água temperada ou água fria) [4]. A título de exemplo, a Figura 1.1 apresenta algumas das imagens disponíveis no site da *Food and Agriculture Organization* (FAO) para os vários sistemas de aquacultura [5].

A aquacultura é atualmente um dos sectores de produção alimentar com maior expansão ao nível mundial, com um crescimento três vezes superior ao da produção de carne animal [6]. Portugal é o terceiro maior consumidor de peixe do mundo, mas só produz oito mil toneladas de peixe de aquacultura por ano. Isto porque os modelos de produção atuais não conseguem competir com os baixos preços de mercado de países como a Espanha e a Grécia. Ainda assim, o nosso país quer chegar às 30 mil toneladas até 2013. [7] Nos últimos 30-40 anos têm-se verificado enormes avanços técnicos neste sector, como o aperfeiçoamento dos alimentos artificiais, principalmente quanto à sua estabilidade na água e composição nutricional, e o melhoramento das técnicas de arejamento artificial que passaram a ser adotadas em diferentes regiões [8]. As taxas de crescimento do produto cultivado chegam a ser superiores a 30 % por

ano, beneficiando ainda da pronta disponibilidade de recursos naturais e da sua fácil interação com o meio ambiente.

A intensificação do cultivo aquático tem levantado, porém, muitas reservas no que diz respeito à conservação dos recursos naturais envolventes. A utilização de recursos hídricos no sector 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].



Figura 1. 1- Sistemas de aquacultura diversos, extraídos em [5]

1.2. Compostos presentes em aquacultura

Na aquacultura são utilizados uma vasta gama de compostos químicos, como antibióticos, parasiticidas, fertilizantes, anestésicos, hormonas, oxidantes e algicidas /herbicidas. Os riscos associados à utilização destes compostos encontram-se indicados na tabela 1.1 [9]. Eles dependem essencialmente do grupo em que eles se inserem e da forma/dose com que o composto em causa é introduzido no sistema. De uma forma geral, são os antibióticos que têm despertado uma maior preocupação no domínio da segurança pública.

Os antibióticos mais utilizados estão presentes na tabela 1.2. A introdução destes compostos no contexto da aquacultura deve-se tanto a fins terapêuticos como a

profiláticos, tendo em vista a intensificação da produção e o subsequente aumento de rendimento económico no sector [10]. Esta prática pode colocar em risco a saúde pública, tanto pela ingestão direta de antibiótico no peixe, como através do consumo de água contaminada. Para além disso, a disseminação destas drogas no meio aquático coloca em risco a normal sobrevivência das espécies envolvidas e daquelas que dependem direta ou indiretamente destes recursos.

Tabela 1. 1- Exemplos de alguns compostos utilizados em aquacultura e potenciais riscos, numa tabela extraída de [11].

Tipo de compostos	Exemplos	Potenciais riscos
Antibióticos	Oxitetraciclina (terramicina); sulfadimetoxina ormetoprim; Amoxicilina tetrahidratada;	Desenvolvimento de bactérias resistentes; resíduos de comida.
Desparasitante	Cipermetrina	Toxicidade aguda para organismos marinhos
	Carbaril	Toxicidade aguda para organismos marinhos
	Triclorfórmio	Toxicidade aguda para organismos marinhos
	Formalina	Tóxico; irritante para os manipuladores.
Fertilizantes	Misturas de compostos com nitrogénio, fósforo e oligoelementos	Contribui para um enriquecimento nutricional.
Anestésicos	Metanossulfonato	Cancerígeno
Hormonas	Gonadotrofina coriónica humana	(mínimo)
Oxidantes	Permanganato de potássio	Explosivo; irritante para os manipuladores.
	Peróxido de hidrogénio	Irritante para os manipuladores.
	Hipoclorito de cálcio	Tóxico; irritante para os manipuladores.

O risco mais conhecido associado à indevida utilização de antibióticos é o aparecimento de estirpes microbianas resistentes a esses mesmos antibióticos (tabela 1.2). Este registo significa que alguns desses antibióticos se tornaram ineficazes no tratamento de algumas infeções ao nível humano [12].

Tabela 1. 2- Exemplos de aparecimento de estirpes microbianas resistentes estes antibióticos, numa tabela extraída de [12].

Classe dos compostos	Importância para a medicina humana	Exemplo	Bactérias resistentes
Aminoglicosídeos	Criticamente importante	Estreptomicina	Edwardsiella ictulari
Anfericois	Importante	Florfenicol	Enterobacter spp. e Pseudomonas spp.
Lactâmicos beta	Criticamente importante	Amoxilina	Vibrio spp., Aeromonas spp. e Edwardsiella tarda
Lactâmicos beta	Criticamente importante	Ampicilina	Vibrio harvey
Fluoroquinolonas	Criticamente importante	Enrofloxacin	Tenacibaculum maritimum
Macrólidos	Criticamente importante	Eritromicina	Salmonela spp.
Nitrofuranos	Criticamente importante	Furazolidona	Vibrio anguillarum
Nitrofuranos	Importante	Nitrofurantoína	Vibrio harvey
Quinolonas	Criticamente importante	Ácido oxilínico	Aeromonas spp., Pseudomonas spp e Vibrio spp.
Sulfanoamidas	Importante	Sulfadiazina	Aeromonas spp.
Tetraciclina	Altamente importante	Tetraciclina	Aeromonas hydrophila
Tetraciclina	Altamente importante	Oxitetraciclina	Aeromonas salmonicida

Como principais consequências da resistência microbiana destacam-se a mortalidade, resultante da maior incidência de infeções resistentes mais vezes fatais; a morbidade, associada à maior incidência de doenças prolongadas e maior probabilidade de microrganismos resistentes se propagarem a outras pessoas; e os custos, acarretando maiores encargos financeiros com o tratamento, uma vez que se utilizam fármacos novos e mais caros.

Entre os vários grupos de antibióticos associados a episódios de resistência microbiana encontram-se as tetraciclina, cuja utilização no sector da aquacultura tem tido uma grande expressão.

Tetraciclina

A tetraciclina é o antibiótico de largo espectro cuja estrutura se representa na Figura 1.2. Tal como o próprio nome indica, ele é o elemento característico do grupo das tetraciclina, onde se incluem a doxiciclina, a clorotetraciclina e a oxitetraciclina (OXI), entre outros. De uma forma geral, as tetraciclina atuam por inibição da

subunidade 30S do ribossoma procariótico, que se ligaria ao RNA de transferência aquando da síntese proteica, uma condição essencial à sobrevivência celular.

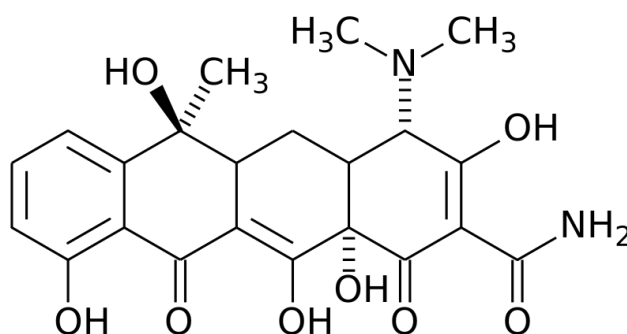


Figura 1. 2- Estrutura química da tetraciclina.

As tetraciclina têm sido amplamente usadas na terapêutica humana e veterinária desde meados dos anos 70 [11]. No domínio da aquacultura, são utilizadas para tratar e prevenir doenças bacterianas de peixes e de outros animais marinhos. A sua intensa utilização aumentou, contudo, a ocorrência de agentes patogénicos nos peixes resistentes a tetraciclina. As doses com que as tetraciclina são introduzidas no meio aquático devem, por isso, ser devidamente controladas, como forma essencial para prevenção desta disseminação de estirpes resistentes.

1.3. Métodos Analíticos para Tetraciclina

As técnicas analíticas utilizadas no controlo de tetraciclina podem ser de natureza microbiológica, separativa, electroanalítica e ótica. Refere-se de seguida uma descrição breve dos métodos instrumentais, no sentido de se poder estabelecer uma base comparativa para as suas principais vantagens e desvantagens.

Técnicas Microbiológicas

As técnicas analíticas que assentam na microbiologia envolvem a utilização de espécies microbianas. A quantificação de antimicrobianos através da sua ação inibitória no desenvolvimento de microrganismos não é uma tarefa fácil, dada a variabilidade associada à resposta biológica e aos longos períodos de tempo necessários para o crescimento celular.

Além disso, estes métodos originam, muitas vezes, falsos positivos e negativos, requerendo análises subsequentes mais rigorosas, no sentido de confirmar o resultado

obtido. Essas análises mais rigorosas envolvem, tipicamente, métodos separativos, sendo, por isso, demasiado caras para serem utilizadas numa perspetiva de rotina.

Técnicas Separativas

As técnicas separativas compreendem, como o próprio nome indica, uma etapa de separação instrumental dos vários componentes na amostra. A cromatografia é o método separativo, por excelência, mais descrito na literatura para a análise de drogas, podendo assumir diversas formas de operação. De uma forma geral, a amostra é transportada por uma fase móvel (seja um gás, líquido, etc.), que é forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou numa superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo a que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária. Os componentes mais facilmente retidos na fase estacionária movem-se muito lentamente no fluxo da fase móvel e os mais fracamente ligados à fase estacionária movem-se mais rapidamente, chegando primeiro ao detetor.

Os sistemas cromatográficos descritos na literatura para as tetraciclinas são baseados em cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) associados a vários modos de detecção [13-21]. O modo mais utilizado é a espectrometria de massa (MS) e MS/MS, em virtude da sua informação inequívoca relativamente à identificação do composto eluído do sistema separativo. No entanto, o equipamento envolvido é demasiado caro para ser adquirido ou mantido por laboratórios correntes. Além disso, a obtenção de bons resultados analíticos implica um processo prévio de extração/purificação dos compostos para remoção de interferências e/ou concentração do analito. Esta etapa extrativa acarreta um dispêndio de tempo de análise, impede uma monitorização em tempo real, e não permite, na maioria dos casos, uma recuperação total do analito, fazendo com que os resultados obtidos nem sempre correspondam a valores exatos.

Técnicas Eletroanalíticas

Os métodos eletroanalíticos fornecem informação química sobre a solução em estudo, através da medida de uma propriedade de natureza elétrica numa célula eletroquímica. Estes métodos oferecem algumas vantagens relativamente aos demais métodos instrumentais: permitem obter informação rápida de natureza quantitativa para quantidades vestigiais de analito; utilizam equipamento de baixo custo e de fácil monitorização o que aumenta a portabilidade, com possibilidade de efetuar análises de campo; podem fornecer informação sobre a estequiometria e constantes de equilíbrio

dos compostos em estudo, e recorrem a processos de preparação de amostra pouco sofisticados e mais amigos do ambiente.

São vários os métodos eletroanalíticos utilizados na determinação de tetraciclina [22-25], baseiam-se especialmente em medidas potenciométricas com eléctrodos seletivos. As medidas são rápidas e seletivas, mas muitas vezes difíceis de adequar a medidas de campo na ausência de potenciómetros portáteis [26-27]

Técnicas Óticas

A espectrofotometria de UV/Vis é o método ótico clássico mais utilizado do ponto de vista da atividade regular de um laboratório analítico. Consiste na absorção da radiação na gama ultravioleta e visível, medida por um espectrofotómetro. Este equipamento é simples e barato, produzindo informação de natureza essencialmente quantitativa. A sua capacidade de deteção é porém limitada para níveis vestigiais de compostos orgânicos, fazendo com que a sua aplicação no domínio do controlo de tetraciclina em águas seja escassa. Não foi possível encontrar na literatura trabalhos anteriores de referência.

Recentemente, a unidade de investigação onde este trabalho se desenvolve, BioMark/ISEP, publicou um trabalho de natureza ótica que permite a deteção visual de um agente antimicrobiano após o seu contacto com um reagente imobilizado numa matriz sólida [26]. Esta abordagem oferece a vantagem de obter respostas rápidas (<1 minuto) e simplificar todo o processo analítico, resumido apenas ao contacto direto entre a amostra e a superfície sensora.

1.4. Modelos de cores

Um espaço de cor (ou gamut) é um modelo matemático usado para descrever cada cor a partir de fórmulas. O resultado deste tratamento gera uma representação geométrica, tridimensional, onde as cores podem ser visualizadas utilizando um determinado modelo de cor [28].

Existem vários modelos de cores mas alguns modelos conseguem representar mais cores do que os outros, por exemplo o RGB (sistema de cores formado pelo Red, Green e Blue), o CMYK (sistema de cores formado por Cyan, Magenta), Yellow e Preto ("K"ey do inglês=chave, pois é a base)), o HSB (hue, saturation and brightness ou tonalidade, saturação e brilho), o HSL (hue, saturation, and lightness ou tonalidade, saturação e luminosidade) e o CIE-Lab.

As coordenadas dos vários modelos estabelecidos para a cor são, em muitos casos, comuns. O brilho (semelhante a luminosidade) é a quantidade de luz e pode

ser detetado por variações na sua intensidade [28]. A tonalidade é a cor propriamente dita, constituindo o próprio nome da cor, ou seja, vermelho, verde, azul, etc. A saturação corresponde ao grau de intensidade ou croma, e relaciona-se com a pureza ou a opacidade da cor. Por outro lado, quando se utiliza um sistema de coordenadas para determinar os componentes do modelo de cor, está-se a criar o seu espaço de cor. Neste espaço cada ponto representa uma cor diferente. Na necessidade de criar modelos de cores com espaço de cor independente do dispositivo, o comité da CIE criou o modelo de cores HSB e HSL. Estes modelos são semelhantes e têm como aplicações definir as cores nos programas gráficos de computadores para que combinem com a percepção das cores pelo sistema visual humano, utilizando os três eixos indicados na figura 1.3 para definir a cor.

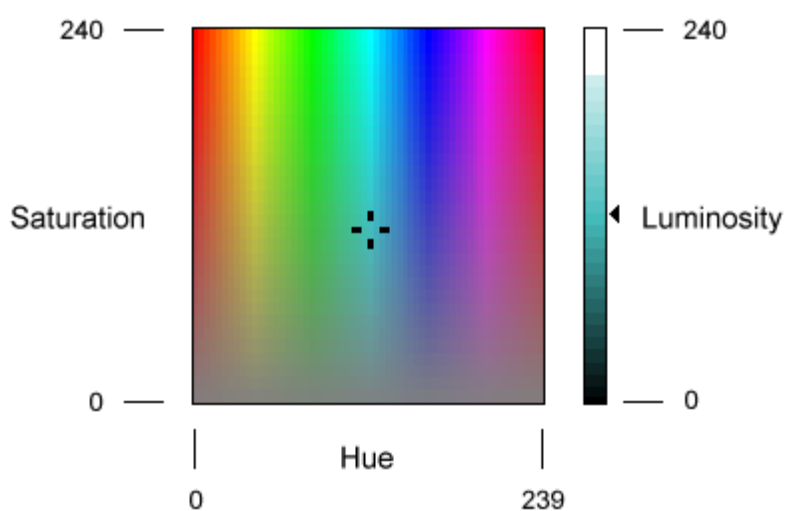


Figura 1. 3- Tonalidade, Luminosidade e Saturação [29].

O programa Paint, disponível pela Microsoft permite o tratamento de imagens baseado no modelo HSL. A caixa de diálogo de cores oferece controlos para especificar valores HSL. Na figura 1.3 podemos observar as escalas de valores que o operador de imagem pode especificar com esses controlos. Na caixa de diálogo de cor, os valores de saturação e luminosidade deve estar no intervalo de 0 a 240, e o valor de tonalidade deve estar na faixa de 0 a 239.

1.5. Considerações Gerais

De um modo geral, o controlo rigoroso da dose de antibiótico aplicada em sistemas de aquacultura exige um método analítico passível de ser utilizado no local de

administração da droga, mas nenhum dos métodos descritos perfaz este requisito (com exceção do trabalho em [26]). Além disso, os métodos centrados em HPLC produzem efluentes de elevada toxicidade para o meio ambiente em geral, pelo que a sua ampla utilização deveria ser evitada. De uma forma geral, os métodos descritos na literatura são demasiado caros para uma aplicação de rotina na monitorização de tetraciclina no domínio da aquacultura.

O único método descrito capaz de se adequar à monitorização local de um antibiótico foi aquele já desenvolvido na BioMark/ISEP [26]. É um método simples, rápido, portátil e com reduzido impacto ambiental. Considerando que a preparação do sistema sensor sólido pode não ser possível em todos os laboratórios, pensou-se neste trabalho adaptar o sistema químico aí considerado a um suporte de papel. O papel é um material barato e o método resultante poderia ser algo análogo a uma tira de papel universal para leitura de pH, cuja coloração varia na medida da concentração de antibiótico. Como prova deste conceito, seleccionou-se como alvo de estudo o antibiótico Oxitetraciclina (OXI).

2. Descrição Experimental

2.1. Material, equipamentos e reagentes

Os balões volumétricos utilizados tinham capacidade entre 10 mL e 100 mL e eram de classe A. Para medição de volumes rigorosos utilizou-se micropipetas de volume regulável da VWR *Signature EHP pipettor*.

As pesagens dos reagentes sólidos foram efetuadas na balança analítica Radwag XA 110/X com uma precisão de $\pm 0,0001$ g. Para acelerar a dissolução dos sólidos utilizou-se o banho ultra-sons Bandelin Sonorex Digitec. O espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 201 foi utilizado para efetuar a leitura das absorvâncias das soluções preparadas. Para determinar os compostos orgânicos foi utilizado o espectrômetro de Infravermelho com transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Attenuated Total Reflectance, FTIR por ATR) da Thermo Scientific Nicolet iS10.

A água utilizada neste trabalho foi de condutividade $< 0,1$ $\mu\text{S}/\text{cm}$ à temperatura ambiente. Os reagentes utilizados foram os seguintes, todos de qualidade analítica reconhecida,: cloreto de ferro hexahidratado (Scharlau), nitrato de chumbo (II) anidro (Riedel deHaen), sulfato de cobre (II) pentahidratado (Panreac), cloreto de amônio (Panreac), ácido clorídrico (Panreac), hidróxido de cálcio (Panreac), cloreto de magnésio hexahidratado (Panreac), sulfato de alumínio 16-hidratado (BDH), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]etanosulfônico (HEPES), tetraciclina (Applichem), cloreto de zinco (Merck), etilenodiamina (Merck), gluteraldeído (GLUT, Fluka), cloranfenicol (Fluka), OXI (Fluka), sulfadiazina (Fluka), norfloxacin (Fluka) e 3-aminopropil-trietoxisilano 99% (APTES, Acros). O etanol utilizado foi aquele disponível comercialmente (96% volume) e o papel de celulose utilizado foi produzido pela Fanoia (referência S-300),

As cores obtidas nas superfícies de papel modificado foram registradas em máquina fotográfica digital (Samsung PL150 com resolução 2560x1920) e/ou em scanner (Brother MFC 7320 com resolução 850x1169).

2.2. Procedimentos para formação de complexos em meio aquoso

A primeira parte do trabalho prático centrou-se na identificação das espécies metálicas capazes de formar complexos corados com a OXI e o efeito do meio de

formação desses complexos, no que diz respeito a composição e pH. Para este efeito, misturaram-se 2,0 mL de OXI $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L com 1,0 mL da solução aquosa que continha a espécie metálica com uma concentração igual a $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. Estas soluções foram preparadas em água, em HCl $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L ou em HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L e os diferentes resultados comparados em termos de absorção espectral.

2.3. Procedimentos de modificação do papel

A modificação da celulose do papel teve por objetivo complexar o papel modificado com os iões selecionados no ponto anterior.

Os procedimentos gerais dessa modificação foram dois: (i) APTES, numa solução a 10%, preparada em etanol (tabela 2.1) ou em HEPES (tabela 2.2); ou (ii) GLUT, numa solução a 2,5% preparada, de igual modo, em água (tabela 2.3) ou em HEPES (tabela 2.4). Os vários iões selecionados no estudo anterior foram testados em cada uma das condições enunciadas, avaliando a eficiência dessa modificação através do contacto final com duas soluções padrão de OXI e monitorização subsequente da cor resultante. Aos papéis modificados com iões de cobre, ferro ou cálcio foram atribuídas as siglas A, B e D, respetivamente, e aos controlos negativos destas modificações a sigla C. Todos os papéis dessas siglas com o número 1 foram guardados para controlo posterior em FTIR e aqueles com a atribuição “R” assinalaram a réplica de cada ensaio. Os sensores de papel obtidos através destes procedimentos foram identificados pelo nome do agente modificador (APTES ou GLUT), seguido do nome do solvente (etanol, HEPES ou H₂O).

2.4. Procedimento para análise de espectros pelo FTIR

Os espectros de infravermelho foram coletados após a correção de fundo e sob o controlo da temperatura ambiente / humidade. Foram realizadas 19 análises, o eixo do X representa o comprimento de onda (varia entre 500-4000 cm^{-1}), e o eixo do Y representa a transmitância (em %). A resolução do equipamento é de 4000.

Tabela 2. 1- Preparação do papel sensor APTES/etanol (■ : contém; ■ : não contém).

Amostra	Agente de modificação do papel (3 h)		Espécie metálica (30 minutos)			OXI (5 minutos, mol/L)	
	Etanol	APTES	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Ca ²⁺	1,0×10 ⁻³	1,0×10 ⁻²
C1	■	■	■	■	■	■	■
C21	■	■	■	■	■	■	■
C22	■	■	■	■	■	■	■
A1	■	■	■	■	■	■	■
A2	■	■	■	■	■	■	■
A2R	■	■	■	■	■	■	■
A3	■	■	■	■	■	■	■
A3R	■	■	■	■	■	■	■
B1	■	■	■	■	■	■	■
B2	■	■	■	■	■	■	■
B2R	■	■	■	■	■	■	■
B3	■	■	■	■	■	■	■
B3R	■	■	■	■	■	■	■
D1	■	■	■	■	■	■	■
D2	■	■	■	■	■	■	■
D2R	■	■	■	■	■	■	■
D3	■	■	■	■	■	■	■
D3R	■	■	■	■	■	■	■

Tabela 2. 2- Preparação do papel sensor APTES/HEPES (■ : contém; ■ : não contém).

Amostra	Agente de modificação do papel (3 h)		Espécie metálica (30 minutos)			OXI (5 minutos, mol/L)	
	HEPES	APTES	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Ca ²⁺	1,0×10 ⁻³	1,0×10 ⁻²
C1	■	■	■	■	■	■	■
C21	■	■	■	■	■	■	■
C22	■	■	■	■	■	■	■
A1	■	■	■	■	■	■	■
A2	■	■	■	■	■	■	■
A2R	■	■	■	■	■	■	■
A3	■	■	■	■	■	■	■
A3R	■	■	■	■	■	■	■
B1	■	■	■	■	■	■	■
B2	■	■	■	■	■	■	■
B2R	■	■	■	■	■	■	■
B3	■	■	■	■	■	■	■
B3R	■	■	■	■	■	■	■
D1	■	■	■	■	■	■	■
D2	■	■	■	■	■	■	■
D2R	■	■	■	■	■	■	■
D3	■	■	■	■	■	■	■
D3R	■	■	■	■	■	■	■

Tabela 2. 3- Preparação do papel sensor GLUT/Etanol (■ : contém; ■ : não contém).

Amostra	Agente de modificação do papel (50 minutos GLUT em etanol + 50 minutos Etilenodiamina)			Espécie metálica (30 minutos)			OXI (5 minutos, mol/L)	
	Etanol	GLUT	Etilenodiamina	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Ca ²⁺	1,0×10 ⁻³	1,0×10 ⁻²
C1	■	■	■	■	■	■	■	■
C21	■	■	■	■	■	■	■	■
C22	■	■	■	■	■	■	■	■
A1	■	■	■	■	■	■	■	■
A2	■	■	■	■	■	■	■	■
A2R	■	■	■	■	■	■	■	■
A3	■	■	■	■	■	■	■	■
A3R	■	■	■	■	■	■	■	■
B1	■	■	■	■	■	■	■	■
B2	■	■	■	■	■	■	■	■
B2R	■	■	■	■	■	■	■	■
B3	■	■	■	■	■	■	■	■
B3R	■	■	■	■	■	■	■	■
D1	■	■	■	■	■	■	■	■
D2	■	■	■	■	■	■	■	■
D2R	■	■	■	■	■	■	■	■
D3	■	■	■	■	■	■	■	■
D3R	■	■	■	■	■	■	■	■

Tabela 2. 4- Preparação do papel sensor GLUT/H₂O (■ : contém; ■ : não contém).

Amostra	Agente de modificação do papel (50 minutos GLUT em água + 50 minutos Etilenodiamina)			Espécie metálica (30 minutos)			OXI (5 minutos, mol/L)	
	H ₂ O	GLUT	Etilenodiamina	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Ca ²⁺	1,0×10 ⁻³	1,0×10 ⁻²
C1	■	■	■	■	■	■	■	■
C21	■	■	■	■	■	■	■	■
C22	■	■	■	■	■	■	■	■
A1	■	■	■	■	■	■	■	■
A2	■	■	■	■	■	■	■	■
A2R	■	■	■	■	■	■	■	■
A3	■	■	■	■	■	■	■	■
A3R	■	■	■	■	■	■	■	■
B1	■	■	■	■	■	■	■	■
B2	■	■	■	■	■	■	■	■
B2R	■	■	■	■	■	■	■	■
B3	■	■	■	■	■	■	■	■
B3R	■	■	■	■	■	■	■	■
D1	■	■	■	■	■	■	■	■
D2	■	■	■	■	■	■	■	■
D2R	■	■	■	■	■	■	■	■
D3	■	■	■	■	■	■	■	■
D3R	■	■	■	■	■	■	■	■

Em todos os ensaios as amostras de papel de celulose tinham as mesmas dimensões (1 cm x 1 cm). O tempo de reação entre o papel de celulose e os agentes de modificação foi estabelecido após consulta de vários trabalhos descritos na literatura, onde estes agentes eram utilizados enquanto modificadores de superfícies de outra natureza [29]. Todos os resultados obtidos foram registados em imagem digital e comparados visualmente.

2.5. Otimização do papel sensor modificado por APTES (10%) em etanol

O procedimento geral de modificação do papel APTES/etanol foi otimizado através da identificação do “ponto de viragem” e do estudo do efeito das concentrações de APTES e da espécie iónica e do tempo da reação entre o papel de

celulose e o APTES em etanol. Apenas os sensores constituídos com ferro ou cobre foram objeto de estudo nesta fase, uma vez que os sensores de cálcio não promoveram qualquer variação de cor nos ensaios anteriores. Todos os resultados obtidos foram registados em imagem digital e comparados visualmente.

2.5.1. Ponto de viragem

O ponto de viragem foi aqui entendido como a concentração mínima de OXI capaz de causar a primeira mudança na cor do papel perceptível ao olho humano. Para este efeito, os sensores APTES/etanol foram mergulhados em soluções de OXI de concentrações entre $5,0 \times 10^{-9}$ mol/L e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

2.5.2. Concentração APTES

O sensor de papel foi obtido com soluções de APTES de concentrações iguais a 1, 10, 50 e 100%, preparadas em etanol. O procedimento geral experimental seguiu o alinhamento indicado na tabela 2.1. As concentrações de OXI foram $1,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L.

2.5.3. Concentração da espécie metálica

Utilizando a concentração de APTES que permitiu melhores resultados por comparação visual, variou-se de seguida a concentração da espécie metálica. Foram testadas as concentrações $1,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-2}$; e $1,0 \times 10^{-1}$ mol/L. O tempo de contacto entre o papel modificado com APTES e a solução da espécie metálica foi igual a 30 minutos. A solução de OXI utilizada neste estudo foi igual a $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e os resultados avaliados por comparação visual.

2.5.4. Tempo de reação de APTES

O tempo de contacto entre o papel e o APTES foi estudado de 2 em 2 minutos, até aos primeiros 30 minutos de reação, e depois a 1 hora e 2 horas. A concentração da espécie metálica testada foi a selecionada anteriormente (ponto 2.4.3) e a de OXI $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Os resultados obtidos foram avaliados por comparação visual.

2.6. Seletividade relativamente a outros antibióticos

A seletividade da resposta do papel modificado face à OXI foi testada relativamente a vários antibióticos que podem ser encontrados em sistemas de aquacultura. Selecionaram-se para este estudo a Norfloxacin, a Sulfadiazina, o

Cloranfenicol e a Tetraciclina, cada um destes representativos de categorias químicas diferentes. O efeito interferente destes antibióticos foi avaliado mergulhando o papel sensor em soluções de antibiótico com uma concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. Estas soluções não continham OXI.

2.7. Aplicação do sensor numa amostra ambiental

Nesta etapa o papel modificado é testado numa escala real, ou seja, utilizando-o para despistar os níveis de OXI presentes em águas de aquacultura. Apesar de as águas de aquacultura serem as amostras ambientais mais propícias a existência de antibióticos, este papel sensor será também testado no despiste de antibióticos em águas ambientais de outras proveniências, como rios, poços, lagos, etc.. Para realização desta análise mergulhou-se o sensor otimizado no ponto 2.4 numa amostra ambiental.

3. Resultados e discussão

A concretização de um sensor modificado de papel para a detecção de OXI em água assenta em dois pressupostos: (i) o desenvolvimento intenso de cor decorrente da presença de um antibiótico e de um metal; e (ii) a imobilização eficaz dessa espécie metálica num suporte de papel. Neste sentido, a primeira fase deste estudo passa por selecionar espécies metálicas que produzem cores, preferencialmente fortes, na presença da OXI, seguindo-se a sua imobilização num suporte de papel.

3.1. Seleção de espécies metálicas

Os metais podem conferir cor a soluções aquosas através da sua complexação com compostos de carácter orgânico. O tipo de cor formada e a sua intensidade dependem das espécies intervenientes e do meio. De uma forma geral, pretende-se que o complexo obtido, ou a reação decorrida, garanta a formação de cor, para que a detecção final possa ser realizada por comparação visual.

Neste estudo, a espécie orgânica é sempre a OXI e a inorgânica variou entre ferro, chumbo, cobre, alumínio, cálcio, magnésio e zinco, cujo estado de oxidação se encontra assinalado na tabela 3.1. Não se tendo encontrado referências específicas na literatura relativas a reações entre Tetraciclinas e metais e as cores decorrentes dessas reações, as espécies metálicas foram escolhidas mediante a sua disponibilidade laboratorial e o preço associado ao reagente.

Os meios para o estudo destas reações variaram entre água, HCl ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e HEPES ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L) e encontram-se indicados na tabela 3.1. Os valores de pH das soluções de HCl e de HEPES enquadravam-se sempre na região ácida, no sentido de promover a solubilidade das espécies metálicas, contribuindo assim para a maior extensão da reação em curso. A concentração de OXI foi igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L em todas as reações, tendo sido fixada num valor elevado de forma a tornar visível qualquer produto formado. A concentração da espécie metálica foi também mantida constante e superior ao valor fixado para a OXI, tendo também por objetivo promover a formação de produto.

Tabela 3. 1- Cores das soluções das espécies metálicas, antes e depois da adição de OXI.

Espécie Metálica	Cor inicial (espécie metálica)			Cor final (espécie metálica+OXI ^{a)})		
	Água	HCl ^{b)}	HEPES ^{c)}	Água	HCl ^{a)}	HEPES ^{b)}
Al ³⁺	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor
Ca ²⁺	Incolor	Incolor	Incolor	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Cu ²⁺	Azul água	Azul água	Azul água	Verde	Verde	Verde
Fe ³⁺	Amarelo	Incolor	Amarelo	Castanho	Castanho	Castanho
Mg ²⁺	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor
NH ⁴⁺	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor
Pb ²⁺	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Branco opaco
Zn ²⁺	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor

a) $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L; b) $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L; c) $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L.

De uma forma geral, apenas os iões Fe³⁺, Cu²⁺ e Ca²⁺ produziram complexos visíveis com a OXI nos meios estudados.

O catião Fe³⁺ apresentou-se incolor ou de cor amarela em solução aquosa. Esta tonalidade amarela associou-se à presença de quantidades vestigiais de hidróxido de ferro (III), uma espécie de elevada estabilidade e tipicamente conotada com a “ferrugem”. A mistura de Fe³⁺ com OXI produziu um complexo castanho, cuja intensidade foi aparentemente elevada e equivalente em todos os meios estudados.

O catião Cu²⁺ isolado conferiu uma tonalidade cor azul água, tipicamente característica desta espécie em solução aquosa. Quando misturada com a OXI, a solução passou a apresentar uma coloração esverdeada, assinalando a presença de um complexo visível ao olho humano ou de uma alteração química do cobre (II) original. Independentemente da reação envolvida, o aspeto importante aqui foi a mudança de cor obtida, facilmente detetada pelo olho humano, passando de cor azul a verde.

O catião Ca²⁺ apresentou-se sempre incolor quando isolado. A sua mistura com a solução de OXI levou à formação de um complexo de cor amarelada. A formação de

um complexo entre o cálcio e os antibióticos do tipo das Tetraciclina é amplamente conhecida, já que a administração deste antibiótico deve ser associada à eliminação temporária de alimentos à base de leite, devido à complexação entre a droga e o cálcio, com subsequente diminuição de actividade terapêutica. A cor formada foi no entanto de reduzida intensidade, sugerindo que o cálcio não deveria ser uma espécie adequada à preparação de sensores em papel seletivos a OXI.

As demais espécies metálicas incluídas neste estudo não produziram qualquer cor na presença da OXI, indicando que não estavam reunidas as condições de formação de algum complexo corado entre este fármaco e a espécie metálica. Apenas a espécie Pb^{2+} , quando preparada em HEPES, levou ao aparecimento de um sólido branco, mas esta coloração não teve interesse prático para o trabalho em curso.

De uma forma geral, apenas os iões Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ca^{2+} poderiam conduzir à preparação de um sensor em papel para a OXI com deteção visual, pelo que apenas estas espécies são alvo de estudo nos ensaios posteriores. Dado que os diferentes meios de preparação das soluções não produziram diferenças significativas nas cores observadas, a preparação das soluções das espécies metálicas poderia ser efetuada em água desionizada. Além das vantagens económicas e ambientais decorrentes deste procedimento, a preparação em água oferecia ainda a possibilidade de eliminar etapas de pré-tratamento de amostra, já que as águas ambientais poderiam ser colocadas diretamente sobre o sensor em papel.

3.2. Modificação química do papel

A imobilização das espécies inorgânicas num suporte de papel seria a condição essencial para reduzir todo o procedimento analítico de deteção da OXI em água a uma simples tira de papel mergulhada numa amostra de água ambiental. De uma forma geral, foi necessário modificar o papel para que este fosse capaz de reter, de forma constante e estável, os iões metálicos na sua superfície. Para este efeito, foram testados dois procedimentos diferentes de modificação de papel, todos estes centrados em nanotecnologia emergente, baseada na modificação de superfícies por monocamadas.

Um dos procedimentos de modificação iniciou-se pela ligação química do reagente APTES às unidades de glucose presentes no papel. Esta reação foi do tipo sol-gel, na qual este reagente se ligou covalentemente às unidades hidroxilo da glucose, através de ligações químicas Si-O. Após esta ligação o papel adquiriu uma nova camada externa, constituída por grupos amina ($-NH_2$). Estes grupos amina são tipicamente

capazes de captar, de modo extenso e estável, espécies iónicas carregadas positivamente, pelo que o papel aminado foi capaz de se ligar a iões de espécies metálicas presentes em meio aquoso.

O segundo procedimento de modificação do papel baseou-se na reação entre os grupos hidroxilo da glucose e os grupos aldeído presentes no GLUT. Esta reação prosseguiu segundo um mecanismo de adição nucleófila, do qual resultou a ligação covalente deste reagente ao papel através de um grupo imina (-C=N-). Na sequência desta reação, o papel adquiriu uma camada externa de grupos aldeído, capazes de reagir, segundo o mesmo mecanismo, com a etilenodiamina. Após esta segunda reação, o papel apresentou grupos amina na sua camada exterior. Estes grupos foram, tal como referidos anteriormente, capazes de captar espécies metálicas, segundo uma reação extensa e na qual o produto obtido foi estável.

Estes dois procedimentos foram testados em meios diferentes, já que foi possível encontrar na literatura descrições das reações envolvidas decorridas em meios diferentes [29]. As cores obtidas nos papéis de celulose, modificados segundo estes procedimentos, podem ser observadas nas tabelas 3.2 a 3.5. Podem também ser consultadas no Anexo A tabelas mais detalhadas sobre este estudo (tabelas A.1 a A.4), onde se associam as cores adquiridas pelo papel ao longo dos procedimentos da sua modificação química.

Nos ensaios com sensores modificados com APTES constatou-se que o papel assumiu a cor das espécies metálicas no qual foi mergulhado. A intensidade de cor foi maior para as modificações efetuadas com o reagente preparado em etanol (tabela 3.2), sugerindo que a reação de ligação do APTES foi mais eficaz nesta condição. Independentemente de serem preparados em HEPES ou etanol, os sensores APTES alteraram a sua cor após contacto com a solução de OXI: os de Cu^{2+} mudaram de azul para verde; os de Fe^{3+} de laranja para castanho; e os de Ca^{2+} aumentaram a intensidade de cor inicialmente observada. As modificações mais acentuadas foram, por isso, verificadas para os sistemas constituídos com cobre ou ferro. Esta modificação de cor dependeu da concentração de OXI na solução onde o papel é mergulhado, já que a cor observada foi mais intensa para a solução de maior concentração.

De uma forma geral, os sensores APTES pareceram mais sensíveis à presença de OXI quando a solução deste reagente foi preparada em etanol. Comparativamente à utilização de HEPES, esta opção ofereceu a vantagem de ser mais económica e mais rápida, por redução do tempo de secagem do papel.

Tabela 3. 2- Cores do sensor APTES/etanol após as subseqüentes modificações químicas e o contacto com OXI a duas concentrações diferentes.




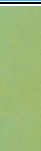

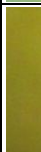
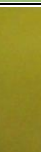
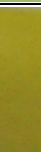

OXI (mol/L)	Cores do sensor APTES/etanol				
	Etanol	APTES/etanol	APTES/etanol/Cu ²⁺	APTES/etanol/Fe ³⁺	APTES/etanol/Ca ²⁺
—					
1,0×10 ⁻³					
1,0×10 ⁻²					

Tabela 3. 3- Cores do sensor APTES/HEPES após as subseqüentes modificações químicas e o contacto com OXI a duas concentrações diferentes.

OXI (mol/L)	Cores do sensor APTES/HEPES				
	HEPES	APTES/HEPES	APTES/HEPES/Cu ²⁺	APTES/HEPES/Fe ³⁺	APTES/HEPES/Ca ²⁺
—					
1,0×10 ⁻³					
1,0×10 ⁻²					

Nos ensaios com sensores modificados com GLUT, a presença das espécies metálicas fez-se notar por ligeiras alterações na cor/uniformidade do papel (tabelas 3.4 e 3.5), não sendo estas tão evidentes quanto as observadas para o reagente APTES, nem dependentes do solvente utilizado (água ou HEPES). Estes registos indicaram que este procedimento de modificação do papel não foi tão eficaz quanto aquele realizado com APTES. Por outro lado, a presença de OXI em contacto com o sensor

foi perceptível apenas com os sensores de Fe^{3+} , já que os sensores constituídos com as outras espécies metálicas não variaram a sua cor após adição de OXI.

Os resultados produzidos pelos sensores de GLUT indicaram que a modificação da celulose por GLUT/etilenodiamina não foi eficaz, já que a superfície de papel não adquiriu a capacidade (esperada) de captar as espécies metálicas em estudo. Por consequência, os sensores GLUT não foram capazes de produzir variações de cor na presença de OXI ou de variar a intensidade dessa cor após aumento da concentração de OXI.

Tabela 3. 4- Cores do sensor GLUT/etanol após as subseqüentes modificações químicas e o contacto com OXI a duas concentrações diferentes.



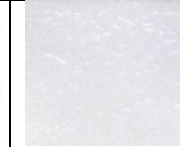
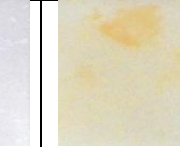



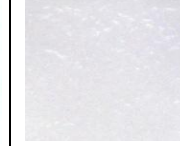




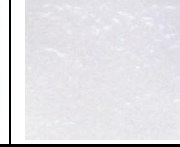









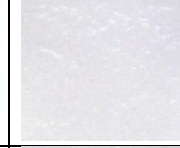
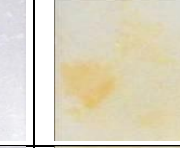



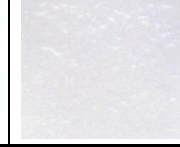









OXI (mol/L)	Cores do sensor GLUT/etanol				
	HEPES	GLU/HEPES/ Etilenodiamina	GLU/HEPES/ Etilenodiamina/ Cu^{2+}	GLU/HEPES/ Etilenodiamina/ Fe^{3+}	GLU/HEPES/ Etilenodiamina/ Ca^{2+}
—					
$1,0 \times 10^{-3}$					
$1,0 \times 10^{-2}$					

Tabela 3. 5- Cores do sensor GLUT/ H_2O após as subseqüentes modificações químicas e o contacto com OXI a duas concentrações diferentes.

OXI (mol/L)	Cores do sensor GLUT/ H_2O				
	H_2O	GLU/ H_2O / Etilenodiamina	GLU/ H_2O / Etilenodiamina/ Cu^{2+}	GLU/ H_2O / Etilenodiamina/ Fe^{3+}	GLU/ H_2O / Etilenodiamina/ Ca^{2+}
—					
$1,0 \times 10^{-3}$					
$1,0 \times 10^{-2}$					

De uma forma geral, o material sensor mais adequado foi o APTES/etanol/ Cu^{2+} e APTES/etanol/ Fe^{3+} . As variações de cor foram mais evidentes e intensas por comparação visual e o custo e o tempo envolvidos na preparação do sensor foram menores. As variações de cor nestes sensores foram reavaliadas para mais valores de concentração de OXI intermédios, constatando-se que resultaram efetivamente da variação deste parâmetro (ver, a título de exemplo, a tabela 3.6). Estes foram, por isso, os materiais seleccionados para os estudos posteriores.

Tabela 3. 6- Evolução da cor do sensor APTES/etanol com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo.

Ensaio	OXI (mol/L)					
	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$
Sem OXI						
Com OXI						

3.3. Otimização do sensor

Uma vez identificado o melhor procedimento para preparação do sensor, este foi otimizado relativamente a vários parâmetros considerados relevantes, tendo sempre por objetivo sentido aumentar a intensidade de variação da cor entre concentrações próximas de OXI. Os parâmetros estudados foram o ponto de viragem, a concentração de APTES e da espécie metálica e o tempo de reação da solução de APTES. Todos os resultados foram registados em fotografia digital, mas avaliados, nesta fase, por comparação visual.

3.3.1. Ponto de viragem

Para uma otimização eficaz do sensor foi necessário recorrer a soluções de OXI cuja variação de resposta perante a alteração de uma variável do processo químico fosse elevada. Do ponto de vista analítico, estas soluções devem compreender um valor de concentração próximo do valor mínimo detetado. Neste sentido, antes de se proceder à otimização propriamente dita, identificou-se a concentração mínima a partir da qual foi possível detetar, por perceção visual, a presença do analito.

Os valores obtidos para os materiais sensores APTES/etanol/ Cu^{2+} e APTES/etanol/ Fe^{3+} encontram-se registados, respetivamente, nas tabelas 3.7 e 3.8. De uma forma geral, o gradiente de concentração observado foi mais intenso para os sensores de papel com espécies de cobre, tendo sido possível observar variações a partir de cerca de $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Apesar de por análise da tabela 3.7 as variações serem notórias a partir de $1,0 \times 10^{-6}$, visualmente pode-se concluir que o ponto de viragem se localizava na concentração $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Relativamente aos sensores baseados em Ferro poder-se-ia apontar um valor de “viragem” da mesma ordem de grandeza, embora neste caso o resultado não fosse tão evidente. Independentemente do rigor com que este valor foi encontrado, pareceu lógico a inclusão deste valor de concentração nos estudos de otimização subsequentes.

Tabela 3.7 - Evolução da cor do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo.

Ensaio	OXI, mol/L					
	$1,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6}$
Sem OXI						
Com OXI						

Tabela 3.7 - Evolução da cor do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo (*continuação*).

Ensaio	OXI, mol/L					
	$1,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-9}$
Sem OXI						
Com OXI						

Tabela 3. 8- Evolução da cor do sensor APTES/etanol/Fe³⁺ com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo.

Ensaio	OXI, mol/L					
	$1,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6}$
Sem OXI						
Com OXI						

Tabela 3.8 Evolução da cor do sensor APTES/etanol/Fe³⁺ com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo (*continuação*).

Ensaio	OXI, mol/L					
	$1,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-9}$
Sem OXI						
Com OXI						

3.3.2. Concentração de APTES

O efeito do valor da concentração de APTES na preparação dos materiais sensores APTES/etanol foi avaliado para concentrações entre 1 e 100%. Para cada uma destas condições, o papel modificado foi mergulhado em soluções de 3 níveis de concentração em OXI: uma de concentração igual àquela identificada no ponto de viragem; outra 10 vezes inferior, que permitiu aferir qualquer melhoria sobre a detetabilidade do sistema; e uma terceira 100 vezes superior à do ponto de viragem, que funcionou como controlo positivo da resposta obtida. Os resultados registados encontram-se indicados nas tabelas 3.9 e 3.10.

Tabela 3. 9- Cores do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} preparado com diferentes concentrações de APTES.


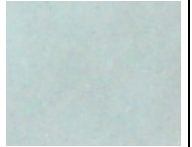




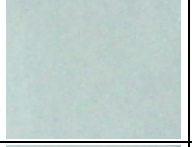
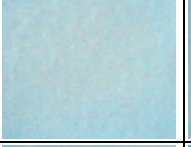
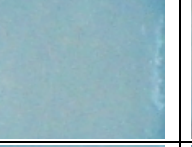
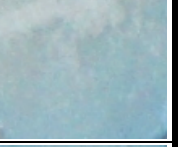
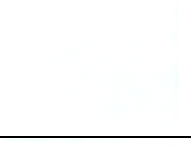
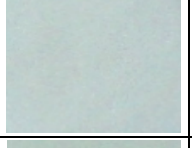
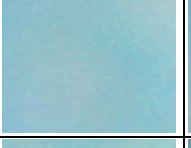
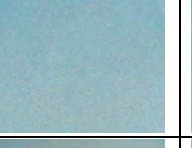
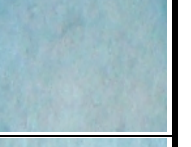

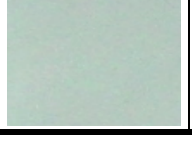
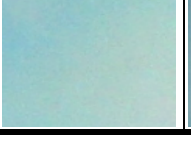
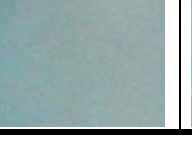


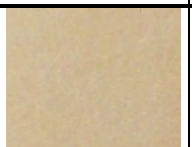
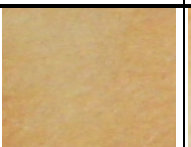
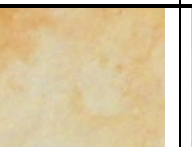
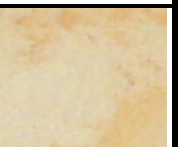



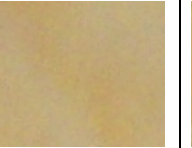


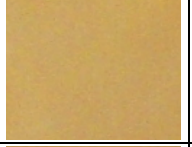
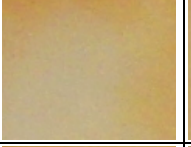
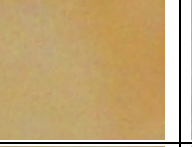


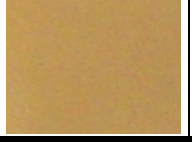
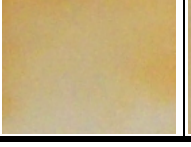
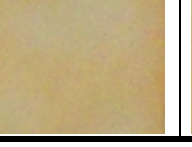
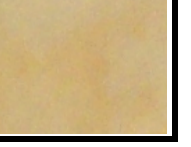
OXI (mol/L)	APTES (%)				
	—	1	10	50	100
—					
$1,0 \times 10^{-8}$					
$1,0 \times 10^{-7}$					
$1,0 \times 10^{-5}$					

Tabela 3. 10- Cores do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} preparado com diferentes concentrações de APTES.

OXI (mol/L)	APTES (%)				
	—	1	10	50	100
—					
$1,0 \times 10^{-8}$					
$1,0 \times 10^{-7}$					
$1,0 \times 10^{-5}$					

Relativamente aos materiais APTES/etanol/ Cu^{2+} , o aumento da concentração de APTES de 1 para 10 % aumentou a eficiência de ligação do cobre à superfície (tabela 3.9), já que o papel modificado assumiu de modo mais intenso a cor desta espécie metálica e que a variação de cor com a concentração foi perceptível a olho nu. Para valores de concentração de APTES superiores, a cor azul formada foi mais escura, parecendo indicar o aumento do teor de cobre sobre o papel, mas as variações de cor face à concentração de OXI foram quase nulas.

Os materiais APTES/etanol/ Fe^{3+} produziram uma resposta diferente daquela observada para os seus análogos de cobre. O aumento da concentração de APTES levou ao aparecimento de heterogeneidades na superfície do papel, ainda antes de contacto direto com solução de OXI. Por outro lado, apenas a modificação com 10 % de APTES foi capaz de promover variação no gradiente de cor com a concentração.

Tendo em conta os resultados obtidos, a modificação do papel foi efetuada sempre com soluções de APTES de concentração igual a 10% nos ensaios posteriores.

3.3.3. Concentração da espécie metálica

A etapa seguinte de preparação do material sensor correspondeu à ligação das espécies metálicas à superfície do papel. Este parâmetro dependia grandemente da concentração da espécie metálica disponível em solução aquosa para este efeito e do seu tempo de contacto com o papel já modificado com APTES. Sendo estas duas variáveis interdependentes, e sendo do interesse analítico reduzir o tempo associado a esta etapa de modificação do papel, optou-se por fixar o tempo deste ensaio em 30 minutos e variar a concentração da espécie metálica entre $1,0 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-1}$ mol/L. Os resultados deste estudo encontram-se nas tabelas 3.11 e 3.12.

Tabela 3. 11- Evolução de cores do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} com diferentes concentrações de Cu^{2+} .






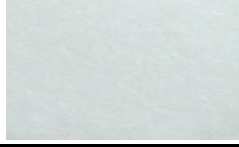



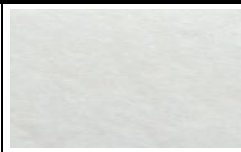
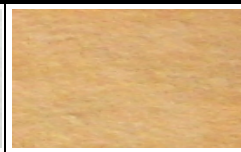
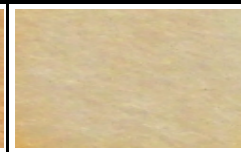

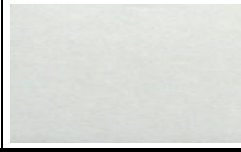


OXI (mol/L)	Cu^{2+} (mol/L)			
	—	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-1}$
—				
$1,0 \times 10^{-5}$				

Tabela 3. 12- Evolução de cores do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} com diferentes concentrações de Fe^{3+} .

OXI (mol/L)	Fe^{3+} (mol/L)			
	—	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-1}$
—				
$1,0 \times 10^{-5}$				

De uma forma geral, o aumento da concentração da espécie metálica de $1,0 \times 10^{-3}$ para $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L levou a um aumento evidente da intensidade de cor adquirida pelo papel, indicando que a concentração de metal na superfície deste aumentou significativamente. O aumento para concentrações de $1,0 \times 10^{-1}$ mol/L não promoveu uma variação de cor tão significativa, embora fosse evidente o aparecimento de uma tonalidade mais esverdeada, no caso do cobre, ou mais escura, no caso do Ferro. Em termos de deteção do antibiótico, as diferenças mais significativas entre o sensor com ou sem OXI foram sempre obtidas com as soluções de concentração mais elevada em espécie metálica. Neste sentido, as modificações de papel descritas posteriormente foram sempre realizados com soluções de Ferro/Cobre de concentração $1,0 \times 10^{-1}$ mol/L.

3.3.4. Tempo de reação do APTES

As reações de APTES com superfícies hidroxiladas descritas na literatura reportaram condições muito diferentes entre si [29-30]. De uma forma geral, os artigos consultados indicaram que a formação de produto não era espontânea, facto que justificou a escolha de 3 horas para a reação do APTES aquando da seleção da concentração deste reagente. No entanto, considerando que este é um período muito longo no processo de modificação do papel, estudou-se nesta fase o efeito do tempo nesta reação.

Neste sentido, as modificações com APTES foram realizadas entre 30 minutos e 3 horas, avaliando a resposta subsequente de sensor para uma concentração de OXI igual a $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Reuniram-se nas tabelas 3.13 e 3.14 os resultados obtidos

neste estudo com os sensores APTES/etanol/ Fe^{3+} e APTES/etanol/ Cu^{2+} , respetivamente.

Tabela 3. 13- Evolução de cores do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} com diferentes tempos de reação com APTES.









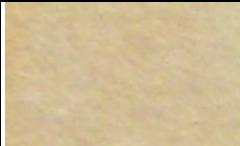
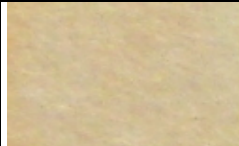
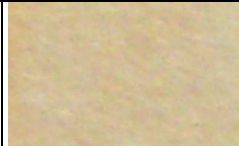
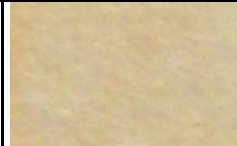


OXI (mol/L)	Tempo de reação de APTES (hora)			
	3	2	1	0,5
—				
$1,0 \times 10^{-5}$				

Tabela 3. 14- Evolução de cores do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} com diferentes tempos de reação com APTES.

OXI (mol/L)	Tempo de reação de APTES (hora)			
	3	2	1	0,5
—				
$1,0 \times 10^{-5}$				

Os resultados obtidos indicaram que a intensidade de cor formada nos papéis modificados não variou ao longo das 3 horas, nem mesmo depois destes serem mergulhados na solução de OXI. Este registo foi obtido tanto para os sensores de cobre como para os sensores de ferro. Os resultados sugeriram, por isso, que a reação seria bem mais rápida do que o esperado, podendo reduzir-se significativamente o tempo consumido na preparação dos sensores.

Procedeu-se de seguida a um controlo temporal da reação até aos 30 minutos, tendo-se realizado ensaios de 2 em 2 minutos. Os resultados obtidos encontram-se indicados na Figura 3.1. Mais uma vez, as cores obtidas não ofereceram diferenças significativas entre si.

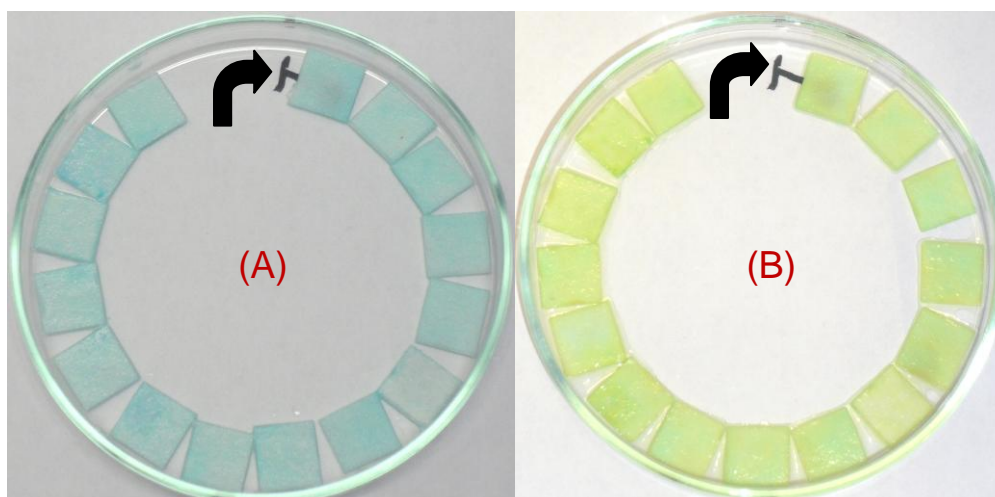


Figura 3. 1- Evolução de cores dos sensores APTES/etanol/ Cu^{2+} (A) e APTES/etanol/ Cu^{2+} / oxitetraciclina (B), a cada 2 minutos (até 30 minutos) de reação com APTES.

De uma forma geral, os dados experimentais permitiram constatar que a reação entre a solução de APTES a 10%, preparada em etanol, e o papel de celulose foi imediata, sugerindo que a elaboração deste sensor poderia ser ainda mais simples e rápida. Esta etapa de modificação do papel foi por isso grandemente reduzida, passando a ser realizada em menos de 1 minuto.

3.4. Controlo da modificação do papel

Para cada uma das variáveis estudadas na modificação do papel houve sempre um sensor produzido especificamente para o controlo dessa modificação através da análise de superfície por FTIR. Foram vários os espectros reunidos neste estudo, apresentados alguns destes neste ponto do documento ou no anexo B.

A Figura 3.2 reúne os espectros de FTIR decorrentes do ensaio de 30 minutos para a reação de APTES a 10 %, em solução etanólica, com o papel. Incluem-se aqui os espectros relativos ao papel de celulose, ao APTES, ao etanol, à solução APTES 10% em etanol e ao papel de celulose modificado com esta solução (ver legenda na figura).

O espectro típico da celulose apresentou uma banda larga de estiramento da ligação O-H, por volta dos 3300 cm^{-1} , presente nos grupos hidroxilo da celulose. Apresentou ainda um pico de forte intensidade por volta dos 1100 cm^{-1} , decorrente do estiramento da ligação C-O. O reagente etanol apresentou um espectro semelhante, no que diz respeito a estes dois pontos de absorção espectral, característicos de estruturas orgânicas baseadas em grupos hidroxilo. Relativamente ao reagente

APTES foi visível o estiramento da ligação C-O, por volta dos $1000-1100\text{ cm}^{-1}$, mas as bandas características de grupos amina, tipicamente localizadas entre $3300-3500\text{ cm}^{-1}$ e decorrentes do estiramento da ligação N-H, foram de fraca intensidade.

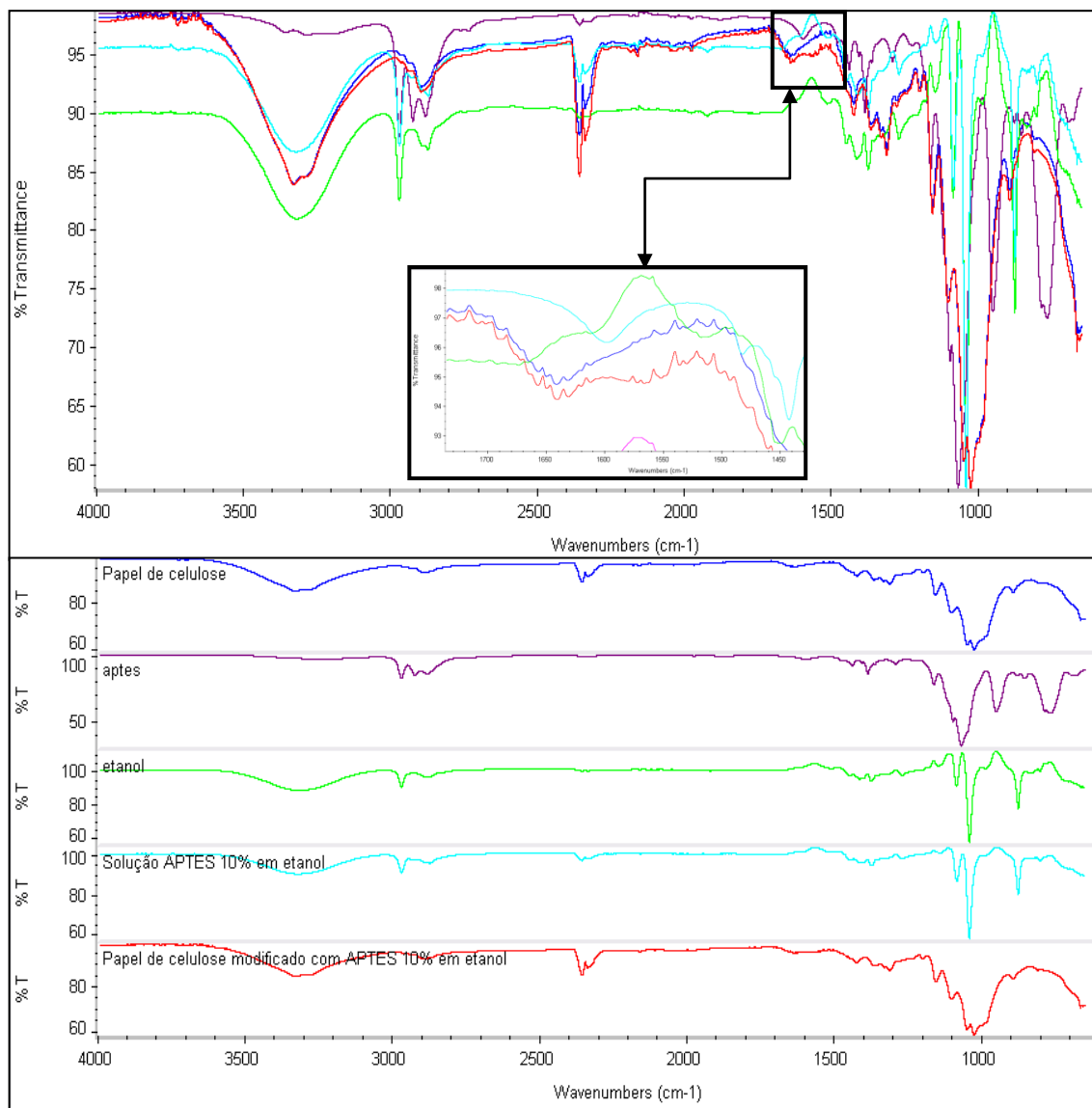


Figura 3. 2- Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel e do papel modificado obtido, relativos ao estudo do tempo da reação de APTES (tempo = 30 minutos).

De uma forma geral, a região espectral de absorção a cerca de $1000-1100\text{ cm}^{-1}$ foi comum a todos os elementos que constituam o processo de modificação do papel, pelo que esta região espectral não poderia contribuir para identificar alterações químicas no papel. Por outro lado, todos os componentes absorveram tipicamente na região dos 3300 cm^{-1} , apresentando aqui as aminas do reagente APTES bandas de menor intensidade do que os álcoois. Neste sentido, a modificação do papel por APTES conduziu à introdução de grupos amina, cuja absorção característica era já

inferior à dos grupos hidroxilo presentes no papel, fazendo com que esta não se tornasse visível no espectro do papel modificado. A única alteração espectral que confirmou a existência de alteração química encontra-se assinalada por um quadrado ampliado na Figura 3.2, mas esta não pode ser atribuída a uma vibração específica, sobretudo pela sua fraca intensidade.

Apesar da presença de cobre no papel ser visível a olho nu, na sequência do controlo das modificações do papel por FTIR optou-se por traçar espectro do sensor obtido após reação do papel modificado de APTES/etanol com Cu^{2+} . A título de exemplo, representou-se na Figura 3.3 o espectro do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} , obtido com papel sujeito a 30 minutos de reação de APTES. Mais uma vez, os resultados obtidos revelaram uma sobreposição entre as bandas características do reagente introduzido no sistema e aquelas que já lá estavam antes.

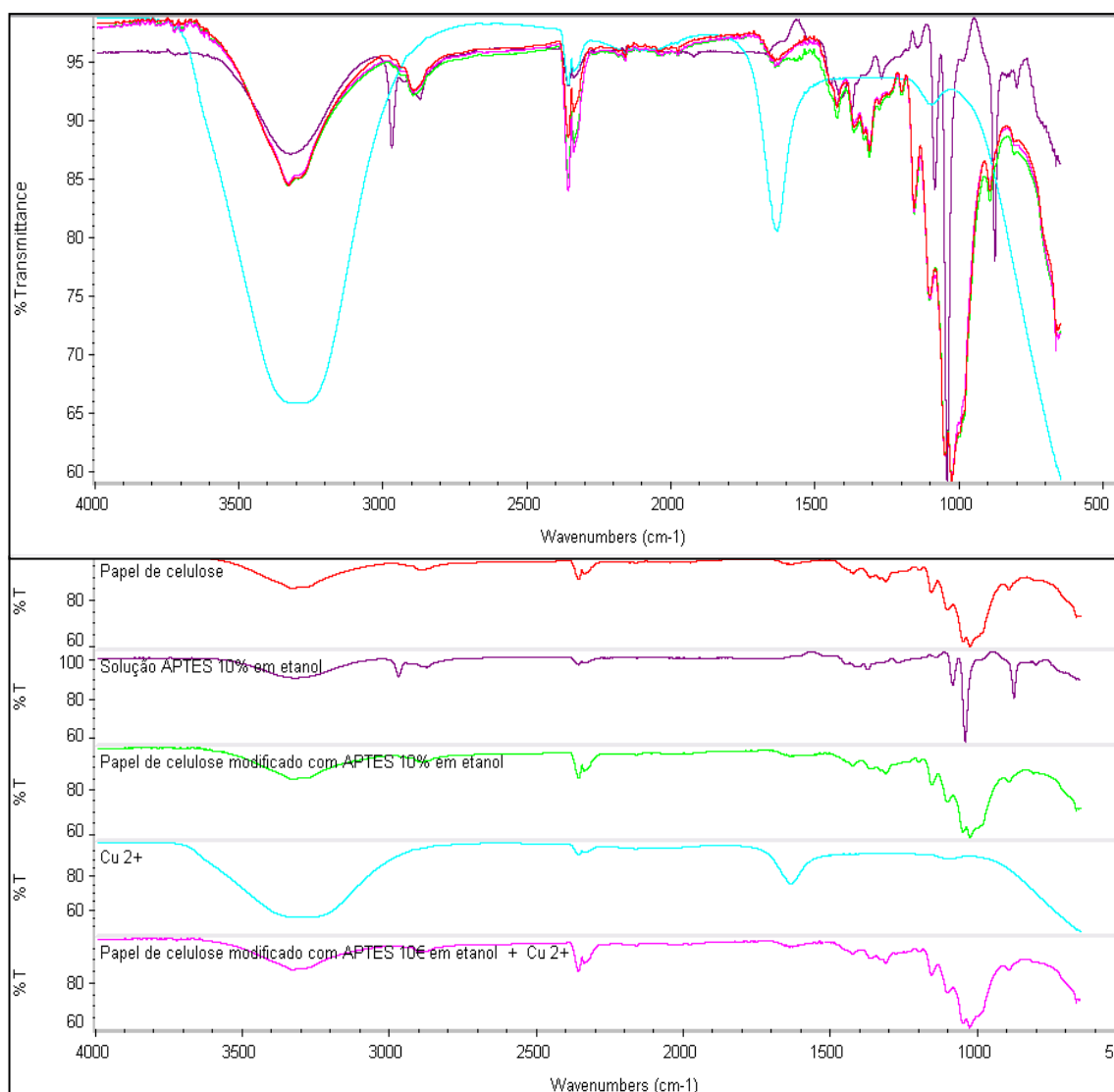


Figura 3. 3- Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel e do papel modificado obtido, com destaque para a ligação de Cu^{2+} (30 minutos para APTES).

De modo análogo ao efetuado para o Cobre, a captação de ferro pela superfície de papel modificada com APTES foi acompanhada por FTIR, apresentando-se na Figura 3.4 o espectro correspondente. Os resultados foram também análogos aos registados para a outra espécie metálica, não se podendo assinalar nenhuma alteração espectral relativa à sua presença sobre o papel de celulose modificado.

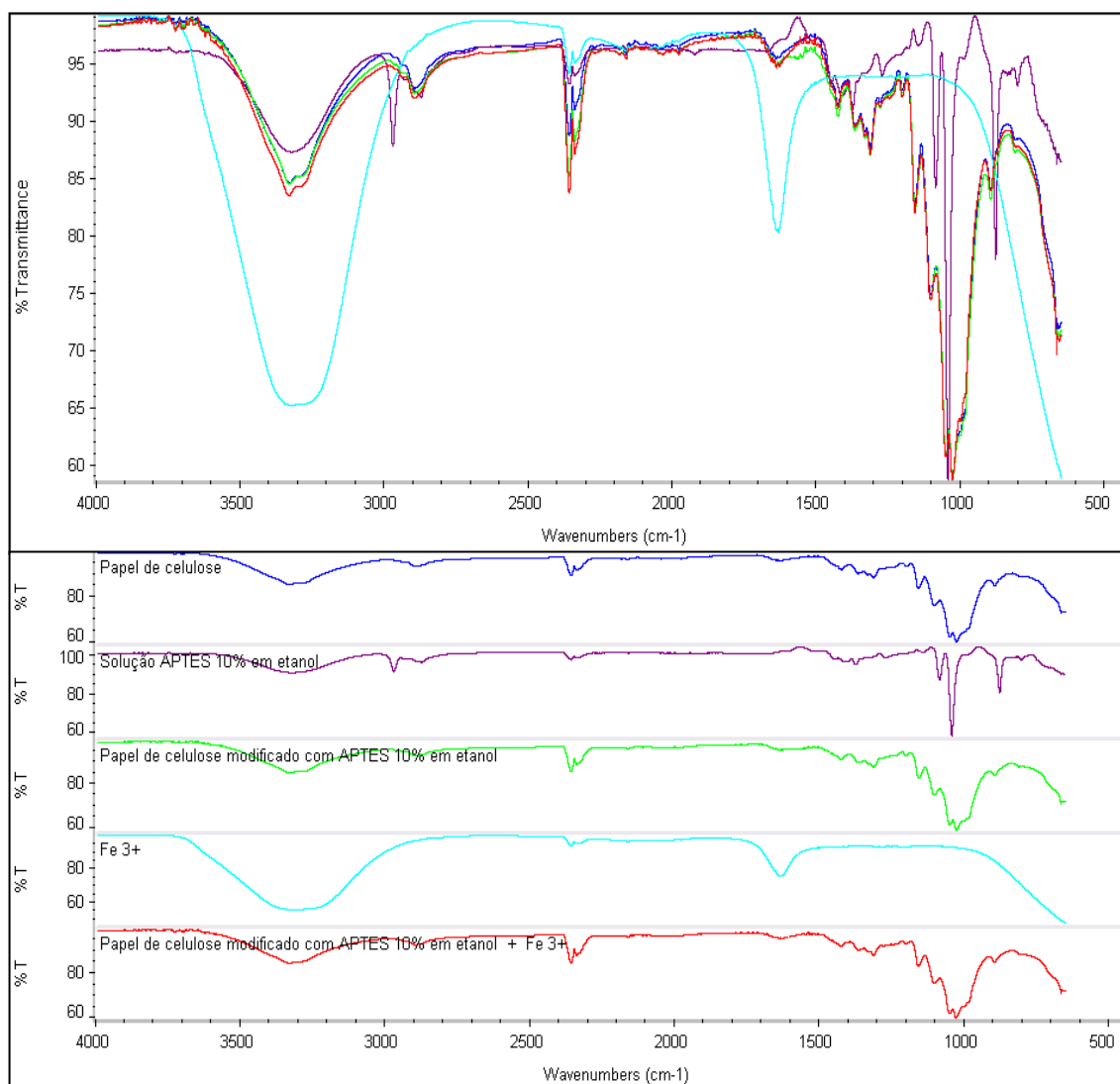


Figura 3. 4- Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel e do papel modificado obtido, com destaque para a ligação de Fe^{3+} (30 minutos para APTES).

Os resultados gerais de FTIR não permitiram constatar a modificação química imposta ao papel, não existindo porém outra técnica disponível capaz de avaliar/controlar esta superfície, cuja modificação acontece numa escala manométrica. Independentemente disso, a alteração química do papel ficou implícita quando se compararam sensores preparados com e sem APTES. Sem APTES o papel não foi capaz de adquirir a cor da espécie metálica, concluindo que esta reação decorreu

conforme esperado. A presença da espécie metálica foi confirmada sempre visualmente, pela cor adquirida pelo papel.

3.5. Parâmetros gerais de calibração do sensor

A aplicação do material sensor à análise quantitativa requereu informação adicional, para além da comparação visual, que permitisse aferir uma relação matemática entre a concentração e a cor. Para este efeito, procedeu-se à calibração do material sensor, mergulhando-o numa gama alargada de concentrações de OXI. As diferentes cores obtidas foram registadas, numa fase inicial, por fotografia conjunta. Para eliminar variações de cor/luminosidade ambiente, os materiais relativos à mesma calibração foram sempre fotografados em conjunto. A imagem foi importada para o programa Paint[®] do Windows, no sentido de adquirir as coordenadas da cor pelo modelo HSL.

Os resultados obtidos com os sensores APTES/etanol/ Cu^{2+} e APTES/etanol/ Fe^{3+} foram indicados, respetivamente, nas tabelas 3.15 e 3.16. Os valores aí encontrados correspondem à média e ao desvio padrão da leitura de 3 pontos escolhidos aleatoriamente em cada imagem recolhida. A primeira abordagem matemática sobre estas coordenadas procurou estabelecer relação linear entre a concentração de OXI e cada uma das coordenadas, individualmente. Não se verificando esta relação, optou-se por variadas abordagens matemáticas de transformação das coordenadas.

A abordagem que mais se aproximou a uma tendência linear foi a soma da tonalidade com a luminosidade em função do logaritmo da concentração de OXI. A regressão linear obtida para cada um dos sensores pode ser observada nas Figura 3.5 e 3.6. Os sensores APTES/etanol/ Cu^{2+} produziram uma resposta linear a partir de $5,0 \times 10^{-7}$ mol/L e os APTES/etanol/ Fe^{3+} apresentaram resposta próxima da linear entre $5,0 \times 10^{-7}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L.

Tabela 3. 15- Coordenadas de cor das imagens dos sensores APTES/etanol/ Cu^{2+} em diferentes concentrações de OXI, obtidas por fotografia.

OXI, mol/L	Tonalidade	Brilho/Luminosidade	Saturação	Tonalidade + Luminosidade
—	130±2.52	156±2.08	64±11.59	286
$1,0 \times 10^{-3}$	99±3.606	97±1	38±1.5275	196
$5,0 \times 10^{-4}$	88±8.963	125±8.505	30±3	213
$1,0 \times 10^{-4}$	88±2.082	137±1.528	24±2	225
$5,0 \times 10^{-5}$	127±2.309	128±5.033	34±3.6056	255
$1,0 \times 10^{-5}$	132±3.215	137±3	50±2.082	269
$5,0 \times 10^{-6}$	127±0.577	139±9.018	52±1.5275	266
$1,0 \times 10^{-6}$	127±1.732	126±3.216	44±2	253
$5,0 \times 10^{-7}$	137±3.056	171±7.8105	48±3.7859	308
$1,0 \times 10^{-7}$	123±1.732	159±2.8868	53±5.2915	282
$5,0 \times 10^{-8}$	132	151±3.2146	62±2.0817	283
$1,0 \times 10^{-8}$	127±2.309	134±1	46±2.6458	261
$5,0 \times 10^{-9}$	132±3.215	160±2.5166	54±7.2111	292

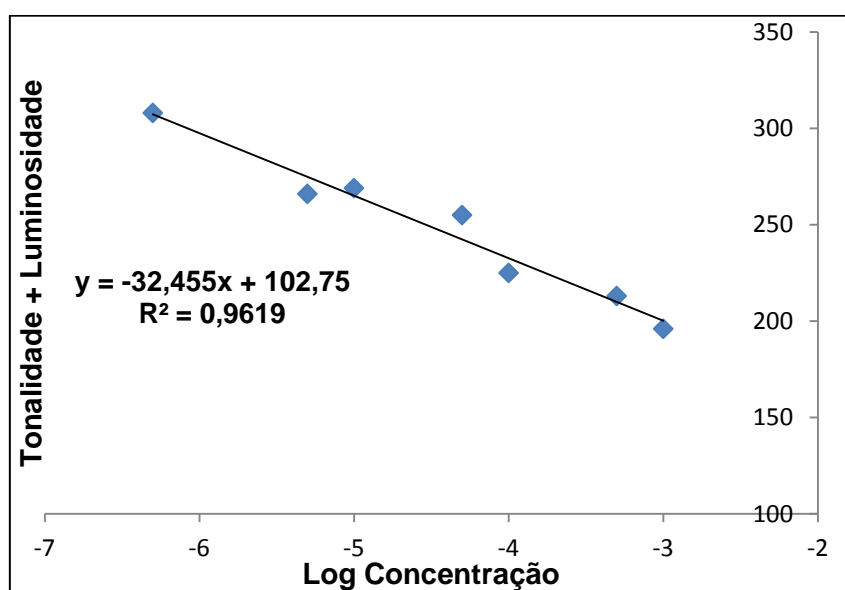


Figura 3. 5- Curva de Calibração do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+}

Tabela 3. 16- Coordenadas de cor das imagens dos sensores APTES/etanol/ Fe^{3+} em diferentes concentrações de OXI, obtidas por fotografia.

OXI, mol/L	Tonalidade	Brilho/Luminosidade	Saturação	Tonalidade + Luminosidade
—	27±1,155	175±17,01	126±6,022	153
1,0×10 ⁻³	26±1,732	160±2,082	172±9,7125	186
5,0×10 ⁻⁴	26±0,5774	158±1	165±12,49	184
1,0×10 ⁻⁴	26	159±3,2146	152±3,055	185
5,0×10 ⁻⁵	25±0,5774	161±5,6862	157±5,0332	186
1,0×10 ⁻⁵	26±1	171±3,5119	142±22,74	197
5,0×10 ⁻⁶	28±1	191±0,577	235±2,887	219
1,0×10 ⁻⁶	28±1	192±4,04	226±15,95	220
5,0×10 ⁻⁷	26±1,5275	169±1,7320	136±15,50	195
1,0×10 ⁻⁷	28±1,5275	162±2,6457	121±1,1547	190
5,0×10 ⁻⁸	28±0,5774	169±2,6458	148±8,3267	197
1,0×10 ⁻⁸	27±0,5774	169±2,5458	162±7,0946	196
5,0×10 ⁻⁹	25±1	161±3,6056	130±7,8102	186

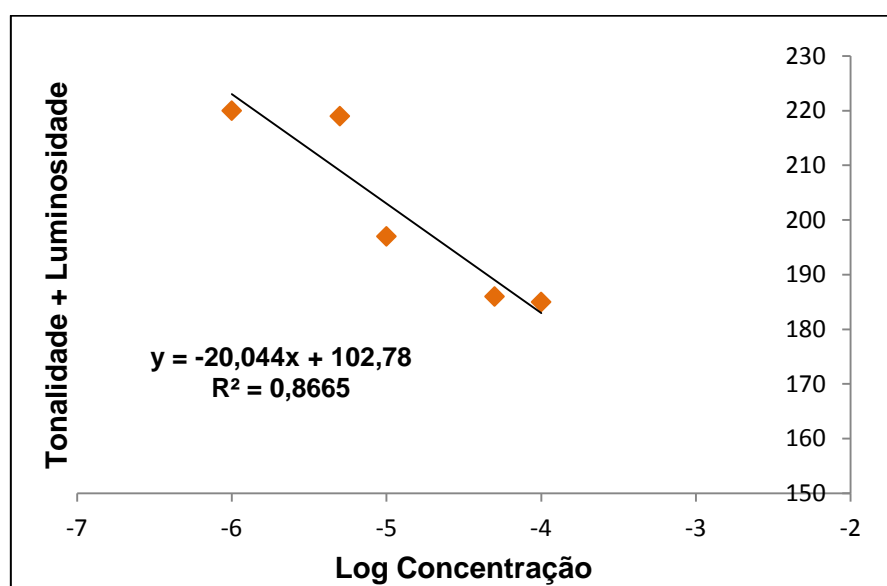


Figura 3. 6- Curva de calibração do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} .

Tendo em vista minimizar a influência das condições com que a fotografia foi adquirida, as imagens foram ainda obtidas por digitalização num scanner e processadas analiticamente da mesma forma. As imagens, as coordenadas e as curvas de calibração correspondentes foram representadas no Anexo C. Em geral, os resultados indicaram que a digitalização seria uma alternativa à aquisição de imagem por fotografia.

3.6. Sensibilidade a outros antibióticos

A seletividade de um material sensor relativamente ao composto para o qual foi desenhado é uma característica muito importante do ponto de vista analítico, quando se pretende que esse material seja aplicado em condições próximas das reais.

Neste sentido, os sensores foram colocados em contacto com outros antibióticos utilizados em sistemas de aquacultura da região Ibérica. Os antibióticos escolhidos para este estudo foram a Norfloxacinina, a Sulfadiazina, o Cloranfenicol e a Tetraciclina. Os resultados obtidos nestes ensaios podem ser observados nas tabelas 3.17 e 3.18.

Tabela 3. 17-Resposta do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} a outros antibióticos.

















OXI (mol/L)	Antibiótico (0,1 mol/L)			
	Norfloxacinina	Sulfadiazina	Cloranfenicol	Tetraciclina
—				
$1,0 \times 10^{-5}$				

Tabela 3. 18-Resposta do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} a outros antibióticos.

OXI (mol/L)	Antibiótico (0,1 mol/L)			
	Norfloxacinina	Sulfadiazina	Cloranfenicol	Tetraciclina
—				
$1,0 \times 10^{-5}$				

De uma forma geral, a cor do sensor manteve-se inalterada quando este foi imerso noutros antibióticos. Este registo foi independente do metal presente no sensor e teve como única exceção a resposta à Tetraciclina. Dado que a Tetraciclina pertence ao mesmo grupo químico da OXI, este registo era já esperado. Considerando que do ponto de vista terapêutico não faz qualquer sentido a associação de fármacos da mesma categoria química, esta interferência nunca produzirá efeito do ponto de vista prático. Por outro lado, foi possível associar a resposta do sensor como sendo dirigida ao grupo das tetraciclinas e não especificamente à OXI.

3.7. Aplicabilidade na análise de amostras ambientais

O papel modificado foi testado numa escala real, ou seja, utilizado para despistar os níveis de OXI presentes em águas de aquacultura. Apesar de as águas de aquacultura serem as amostras ambientais mais propícias à existência de antibióticos, este papel sensor pode também ser testado no despiste de antibióticos em águas ambientais de outras proveniências, como rios, poços, lagos, etc.. Os sensores foram testado aqui com uma amostra dopada com OXI a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

A tabela 3.19 inclui as imagens obtidas neste ensaio e a tabela 3.20 os valores de média e desvio padrão das coordenadas correspondentes. Estes valores corresponderam à média de 3 leituras de coordenadas de cor em pontos selecionados aleatoriamente. Recorrendo às equações de regressão linear e às coordenadas indicadas na tabela 3.20, procedeu-se ao cálculo da concentração da amostra.

Tabela 3. 19- Resposta dos sensores à presença de OXI numa amostra ambiental real.





Água	Cor do Sensor	
	APTES/etanol/Cu ²⁺	APTES/etanol/Fe ³⁺
Sem OXI		
Contaminada		

Tabela 3. 20-Valores das coordenadas de cor relativas à amostra ambiental.

Sensor APTES/Etanol	Tonalidade	Brilho/Luminosidade	Saturação	Tonalidade+Luminosidade
Fe ³⁺	28±0,5774	114±5,292	70±8,021	142
Cu ²⁺	125±2,0817	118±1	53±4	243

A resposta do sensor APTES/etanol/Fe³⁺ correspondeu a concentração de 0,60 M, muito mais elevada do que o valor incluído na amostra. Pelo contrário, o sensor APTES/etanol/Cu²⁺ forneceu uma concentração igual a 4,8×10⁻⁵ M. Esta disparidade de resposta para uma mesma amostra decorreu das características de linearidade associadas às curvas de calibração correspondentes. A regressão linear do sensor de Cu²⁺ apresentou um R² de 0,9619, enquanto a regressão linear do Fe³⁺ um R² de 0,8665. A concentração da amostra dopada, no caso da calibração do Fe³⁺, encontrava-se fora da curva da calibração pelo que a utilização desta curva para determinação da real concentração de oxitetraciclina na amostra originou uma extrapolação do valor real da amostra.

4. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

Relativamente aos ensaios em solução aquosa, foi possível constatar que as espécies capazes de originar formação de produtos corados na presença de OXI foram o Fe^{3+} , com o Cu^{2+} e o Ca^{2+} . Os produtos baseados em cálcio forneceram as cores de menor intensidade.

A modificação química do papel de celulose produziu uma camada aminada externa sobre a superfície sólida, sendo esta camada capaz de se ligar às espécies metálicas carregadas positivamente. As reacções de sol-gel foram as mais eficazes na produção desta camada, conduzindo a um processo global de modificação do papel rápido e eficaz, sobretudo quando as espécies metálicas foram de cobre. A otimização deste processo permitiu detetar concentrações na ordem dos $0,1 \mu\text{mol/L}$ e uma abordagem quantitativa por aplicação de um tratamento matemático apropriado às coordenadas de cor obtidas.

A resposta do material a outros antibióticos só permitiu detetar tetraciclina, sugerindo que este material pode ser aplicado na monitorização de outras tetraciclinas e que a sua resposta não sofrerá a influência de outras drogas que possam estar presentes no meio.

O material produzido ofereceu características muito vantajosas para a sua aplicação local na monitorização de antibióticos em águas de sistemas de aquacultura, carecendo porém de avaliações mais extensas do ponto de vista da sua aplicação prática.

Numa perspectiva futura, pensa-se que o processo químico de modificação do papel pode ainda ser amplamente optimizado, no sentido de melhorar a detetabilidade do sensor. Incluem-se aqui o tipo de reacção de aminação e as condições em que esta é realizada, bem como o tipo de papel. A escolha de uma espécie orgânica em substituição da espécie metálica pode ainda ser uma condição vantajosa, dependendo da variação de cor resultante do papel com e sem antibiótico e da intensidade dessa variação com a concentração. Do ponto de vista de aplicação prática, será de extrema importância aumentar o número de amostras e diversificar a sua proveniência.

5. Referências bibliográficas

- [1] PMG Mestre, *Elaboração de um Projeto de uma Unidade De Piscicultura* Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, **2008**.
- [2] Food and Agriculture Organization, Cultured Aquatic Species Information Programme, <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/search> (acedido em Dezembro 2011).
- [3] TVR Pillay, MN Kutty, *Aquaculture, Principles and Practices*, 2ª Edição, Wiley-Blackwell, Oxford, England **2005**.
- [4] JS Lucas, PC Southgate, *Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, **2003**.
- [5] Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (UN), <http://www.fao.org/fishery/en>, *on-line*, **2012**. (Acedido a 28 de fevereiro de 2012)
- [6] Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (UN), FAO Fisheries and Aquaculture Department, *The State of World Fisheries and Aquaculture*, 2008, ISBN 978-92-5-106029-2, Rome, **2009**.
- [7] B F Pires, Suplemento integrante do jornal “Algarve 123” nº 644, pág.3, **2010**.
- [8] M Landau, *Introduction to Aquaculture*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1992**.
- [9] RJ Goldberg, MS Elliott, RL Naylor, *Marine Aquaculture in the United States, environmental impacts and policy options*, Pew Oceans Commission, Arlington, Virginia, **2001**.
- [10] JSW Les Burridge, F Cabello, J Pizarro, K Bostick, *Aquaculture*, 306, 7-23, **2010**.
- [11] K Seok-Ryel, L Nonaka, S Satoru, *FEMS Microbiology Letters*, 237, 147-56, **2010**.
- [12] T Defoirdt, P Sorgeloos, P Bossier, *Current Opinion in Microbiology*, 14, 251-258, **2011**.
- [13] S Yudthavorasit, C ChiaoChan, N Leepipatpiboon, *Microchimica acta*, 172, 39-49, **2011**.
- [14] C Chafer-Pericas, A Maquicira, R Puchades, B Company, J Miralles, A Moreno *Aquaculture Research*, 41, e217-e225, 2011.
- [15] A.R. Shalabya, Nadia A. Salamab, Wafaa H. Emama, F.M. Mehayaa, *Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver*, Food Chemistry Volume 124, Issue 4, Pages 1660–1666, **February 2011**.
- [16] S Babi, D Asperger, D Mutavdzic, AJM Horvat, M Kastelan-Macan, *Talanta*, 70, 732–738, **2006**.
- [17] JW Fritz, Y Zuo, *Food Chemistry*, 25, 1297–1301, **2007**.

- [18] Mónica Cecilia Vargas Mamani , Felix Guillermo Reyes Reyes , Susanne Rath, Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD, *Food Chemistry* Volume 117, Issue 3, Pages 545–552. **December 2009**;
- [19] L Yan, X Jin-Zhong, D Tao, L Gong-Hai, *Chinese Journal of Chemistry*, 25, 1294, **2007**.
- [20] U Koesukwiwat, S Jayanta, N Leepipatpiboon, *Journal of Chromatography A*, 1140, 147–156, **2007**.
- [21] Jinhui Zhou, Xiaofeng Xue, Yi Li, Jinzhen Zhang, Fang Chen, Liming Wu, Lanzhen Chen, Jing Zhao, *Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction*, *Food Chemistry* Volume 115, Issue 3, Pages 1074–1080, **August 2009**.
- [22] Yongnian Ni, Shuzhen Li, Serge Kokot, *Simultaneous voltammetric analysis of tetracycline antibiotics in foods*, *Food Chemistry*, 1157-1163, **February 2011**.
- [23] Zhi Young Guo, Pan Pan Gai, Jing Duan, Hui Na Zhang, Sui Wang, *Tetracycline selective electrode based on molecularly imprinted polymer particles*, *Chinese Chemical Letters*, Volume 21, issue 10, 1235-1238, **October 2010**.
- [24] MGF Sales, MCBSM Montenegro, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 1125-1133, **2001**.
- [25] Ling Zhou, Du-Juan Li, Ling Gai, Jian-Ping Wang, Yan-Bin Li, *Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification*, *Sensor and Actuators B: Chemical*, volume 162, issue 1, 201-208, **February 2012**.
- [26] FTCMoreira, MGF Sales, Biomimetic sensors of molecularly-imprinted polymers for Chlorpromazine determination, *Requinte/ISEP*, **2011**.
- [27] TSCR Rebelo, SAA Almeida, JRL Guerreiro, MCBSM Montenegro, MGF Sales Trimethoprim-selective electrodes with molecularly-imprinted polymers acting as ionophores and potentiometric transduction on graphite solid-contact, *Requinte/ISEP*, **2011**.
- [28] Silva, Tâmara, *Desenvolvimento de um sensor ótico para determinação da Norfloxacin*, *Dissertação de Mestrado*, Instituto Superior de Engenharia do Porto, **Julho 2010**.
- [29] Dutra, R.F., Mendes, R.K., Silva, V.L., Kubota, L.T., Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer,

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol.43, issue 5, pages 1744-1750, April 2007.

- [30] Microsoft, http://msdn.microsoft.com/en-us/library/windows/desktop/ms646375%28v=vs.85%29.aspx#hsl_color_model (acedido a 29 de Outubro de 2012).
- [31] Gokhan Demirel , Tuncer Caykara, Baris Akaoglu, Mehmet Cakmak, Construction of a novel multilayer system and its use for oriented immobilization of immunoglobulin G, Science Direct, **2007**.
- [32] Yun-Pu Wang, Kun Yuan, Quan-Lian Li, Li-Ping Wang, Sheng-Jio Gu, Xiao-Wei Pei, Preparation and Characterization of poly (N-isopropylacrylamide) films on a modified glass surface via surface initiated redox polymerization, Science Direct, **2005**.

Anexo A.

Procedimentos de modificação química do papel e cores observadas

Tabela A. 1- Procedimento experimental e resultados observados com o sensor APTES/etanol.



Papel modificado	1º passo (3 horas)		2º passo (30 minutos)				3º Passo (OXI, mol/L, 5 minutos)		
	Etanol	APTES	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Ca ²⁺	Cor Papel	1,0×10 ⁻³	1,0×10 ⁻²	Cor Papel
C1									
C1									
C22									
A1									
A2									
A3									
B1									
B2									
B3									
D1									
D2									
D3									

Tabela A. 2- Procedimento experimental e resultados observados com o sensor APTES/HEPES.




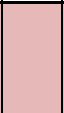


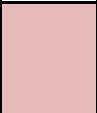
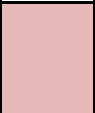




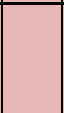


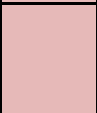
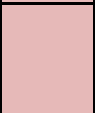




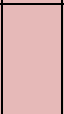



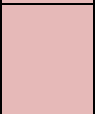




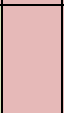


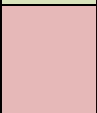
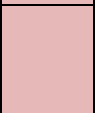
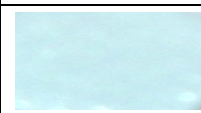



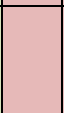



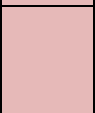




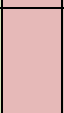

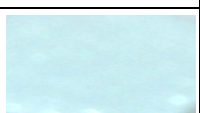
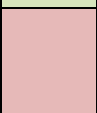

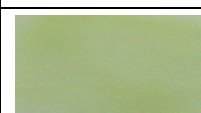
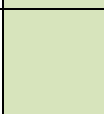



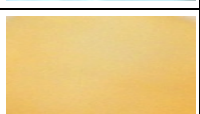
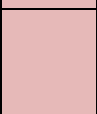
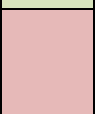
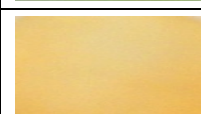
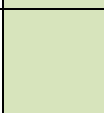




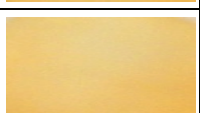

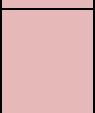
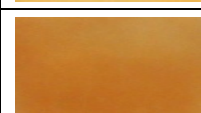
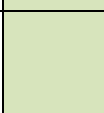




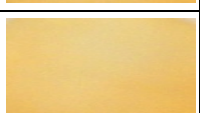
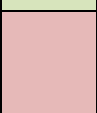


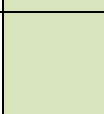


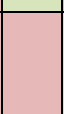

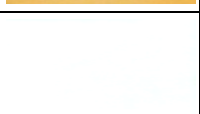
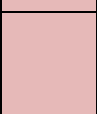
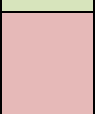

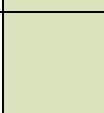


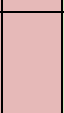

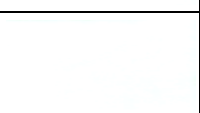

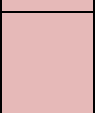
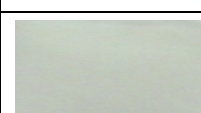
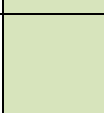
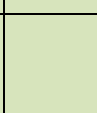

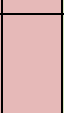

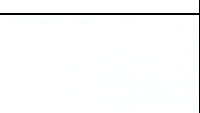
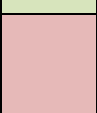

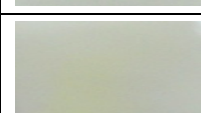












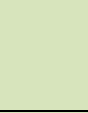






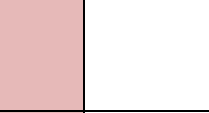


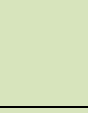



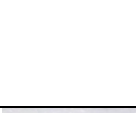


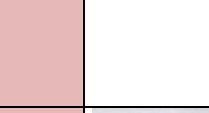






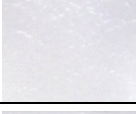





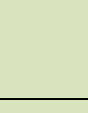













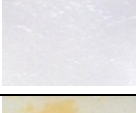


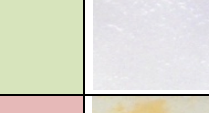






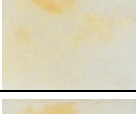
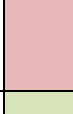
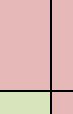


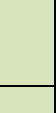


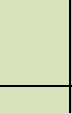


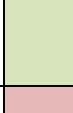
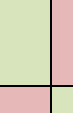
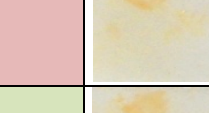




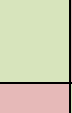
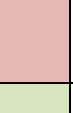

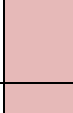
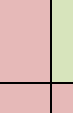
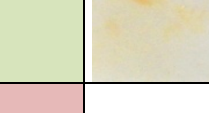


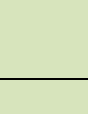


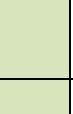

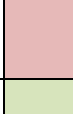
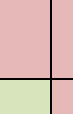
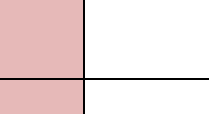

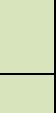



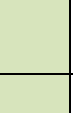
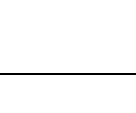
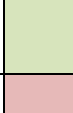
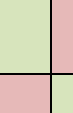
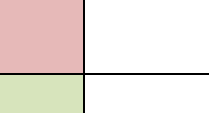










Papel modificado	1º passo (3 horas)		2º passo (30 minutos)				3º Passo (OXI, mol/L, 5 minutos)		
	HEPES	APTES	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Ca ²⁺	Cor do Papel	1,0×10 ⁻³	1,0×10 ⁻²	Cor do Papel
C1									
C1									
C22									
A1									
A2									
A3									
B1									
B2									
B3									
D1									
D2									
D3									

Tabela A. 3- Procedimento experimental e resultados observados com o sensor GLUT/Etanol.

Papel modificado	1º passo (50 minutos)		2º Passo (50 minutos) Etileno-diamina	3º passo (30 minutos)				4º Passo (OXI, mol/L, 5 minutos)		
	Etanol	GLUT		Cu ²⁺	Fe ³⁺	Ca ²⁺	Cor do Papel	1,0x10 ⁻³	1,0x10 ⁻²	Cor do Papel
C1	Verde	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa		Rosa	Rosa	
C21	Verde	Verde	Verde	Rosa	Rosa	Rosa		Rosa	Rosa	
C22	Verde	Verde	Verde	Rosa	Rosa	Rosa		Verde	Rosa	
A1	Verde	Verde	Verde	Verde	Rosa	Rosa	Amarelo	Rosa	Rosa	Amarelo
A2	Verde	Verde	Verde	Verde	Rosa	Rosa	Amarelo	Verde	Rosa	Amarelo
A3	Verde	Verde	Verde	Verde	Rosa	Rosa	Amarelo	Rosa	Verde	Amarelo
B1	Verde	Verde	Verde	Rosa	Verde	Rosa	Amarelo	Rosa	Rosa	Amarelo
B2	Verde	Verde	Verde	Rosa	Verde	Rosa	Amarelo	Verde	Rosa	Amarelo
B3	Verde	Verde	Verde	Rosa	Verde	Rosa	Amarelo	Rosa	Verde	Amarelo
D1	Verde	Verde	Verde	Rosa	Rosa	Verde		Rosa	Rosa	
D2	Verde	Verde	Verde	Rosa	Rosa	Verde		Verde	Rosa	
D3	Verde	Verde	Verde	Rosa	Rosa	Verde		Rosa	Verde	

Tabela A. 4- Procedimento experimental e resultados observados com o sensor GLUT/H₂O.

Papel modificado	1º passo (50 minutos)		2º Passo (50 minutos) Etileno-diamina	3º passo (30 minutos)				4º Passo (OXI, mol/L, 5 minutos)		
	Água	GLUT		Cu ²⁺	Fe ³⁺	Ca ²⁺	Cor do Papel	1,0x10 ⁻³	1,0x10 ⁻²	Cor do Papel
C1										
C21										
C22										
A1										
A2										
A3										
B1										
B2										
B3										
D1										
D2										
D3										

Anexo B.

Controlo da modificação do papel por FTIR

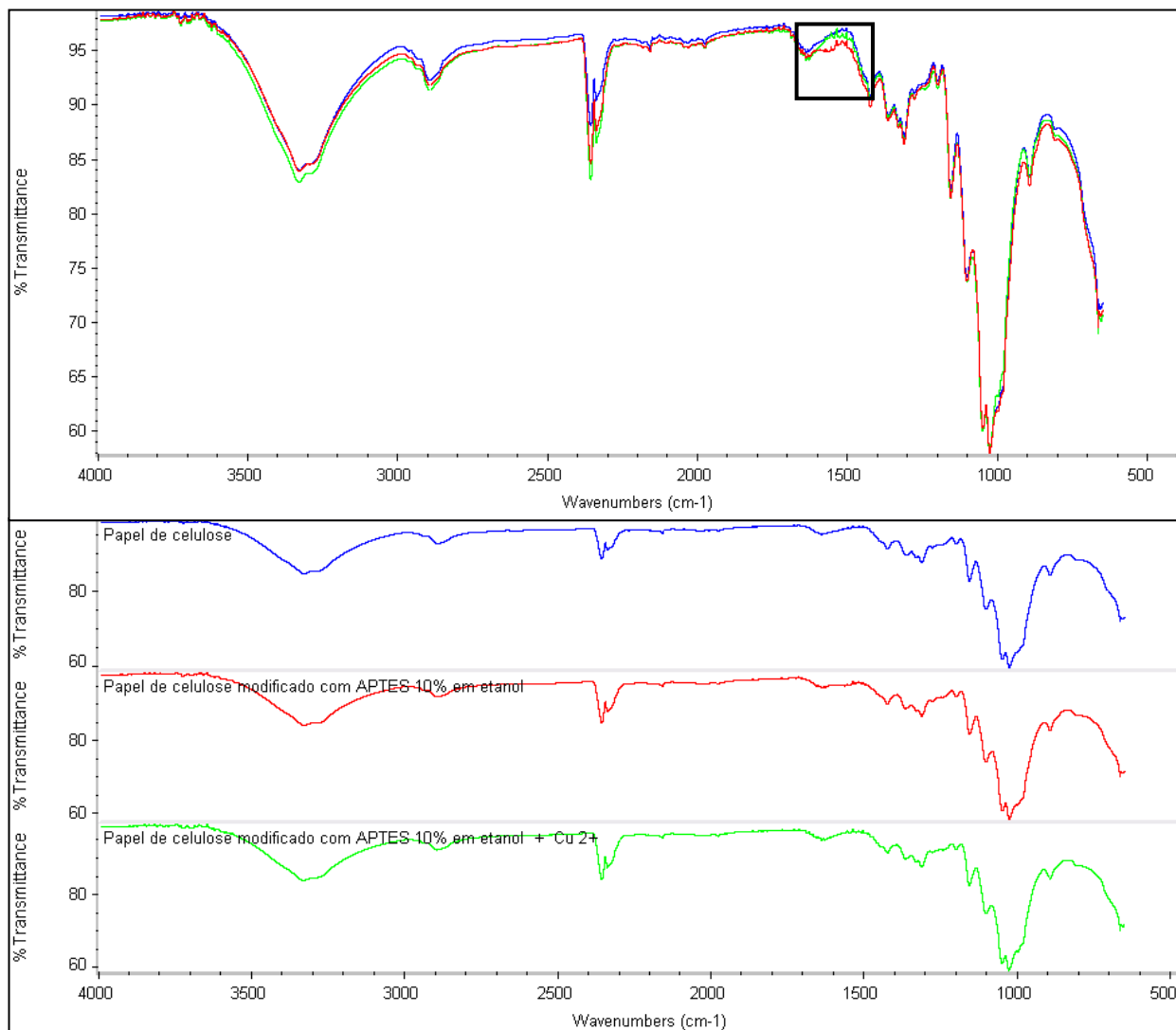


Figura B. 1- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 30 minutos (espécie metálica Cu²⁺)

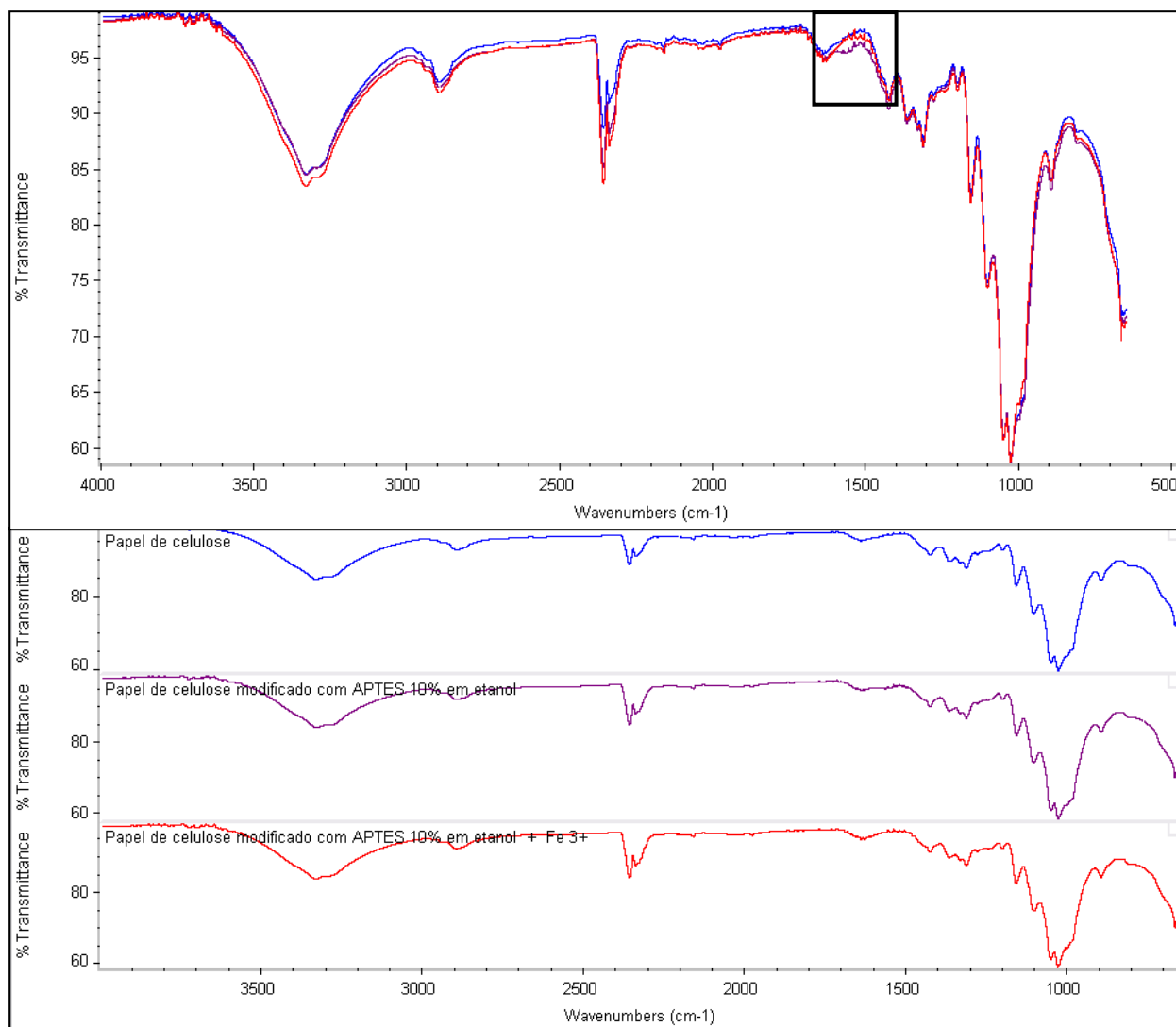


Figura B. 2- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 30 minutos (espécie metálica Fe^{3+})

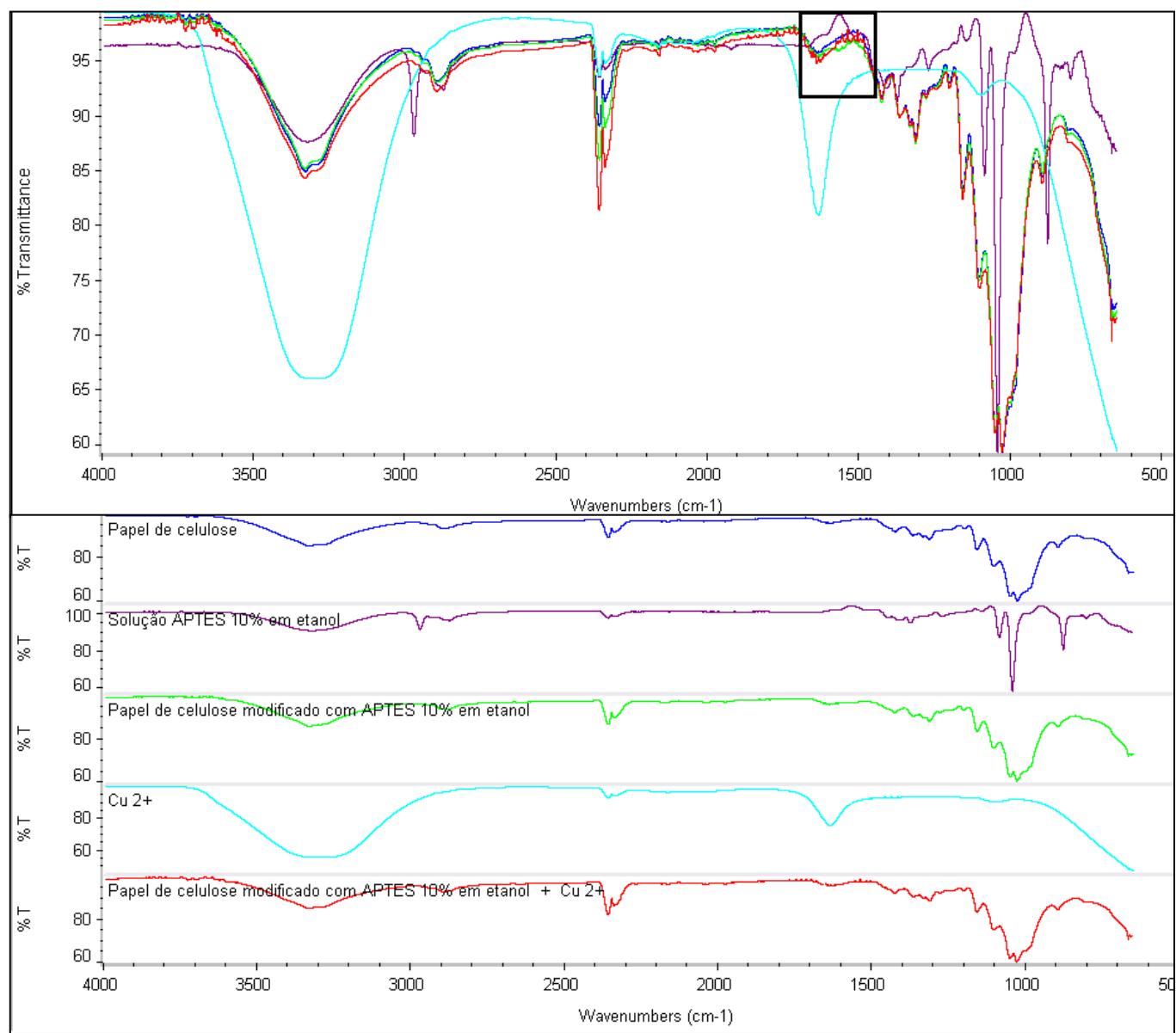


Figura B. 3- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 1 hora. Visualização da ligação do Cu^{2+} ao APTES 10% em etanol.

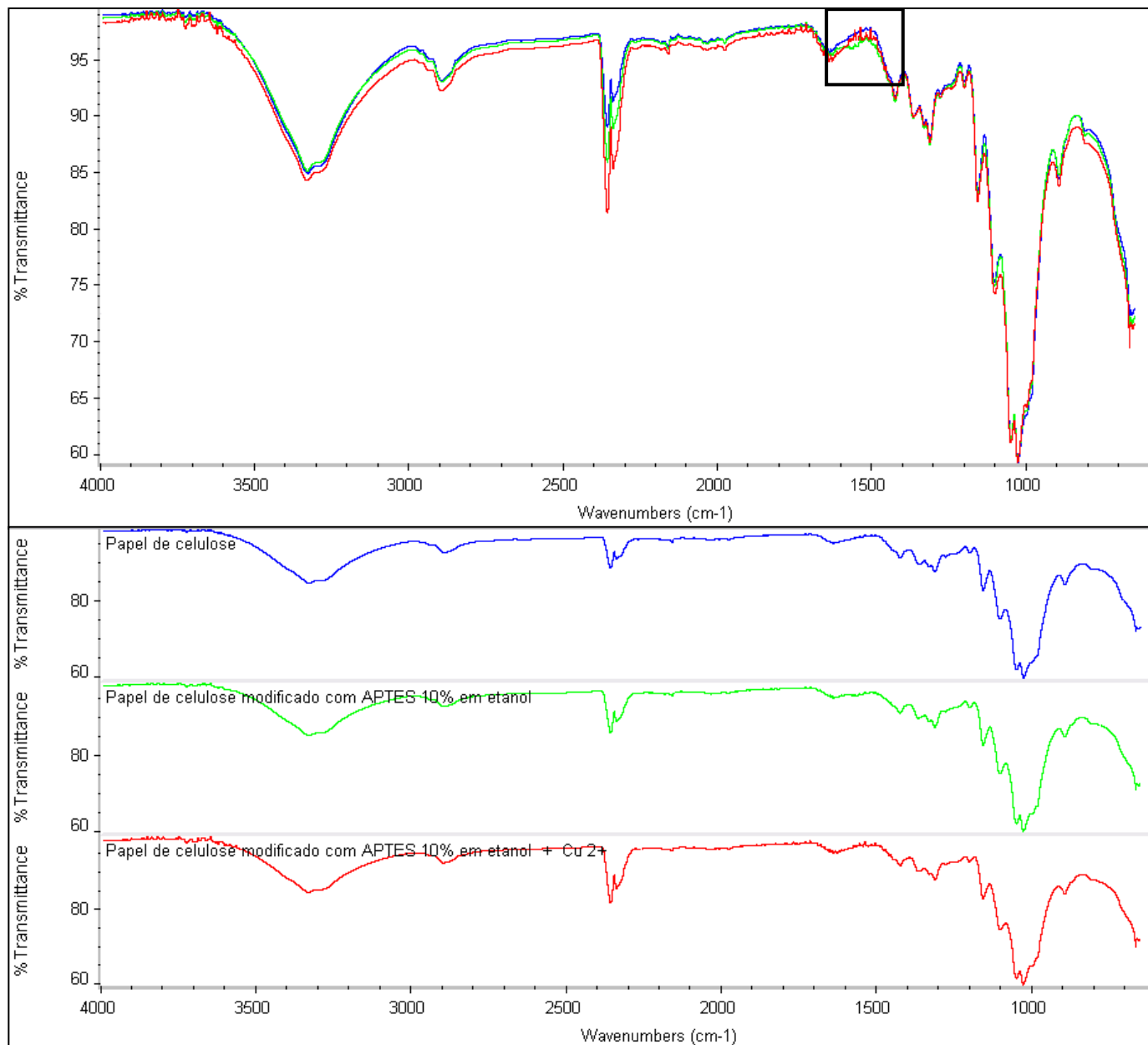


Figura B. 4- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 1 hora (espécie metálica Cu²⁺)

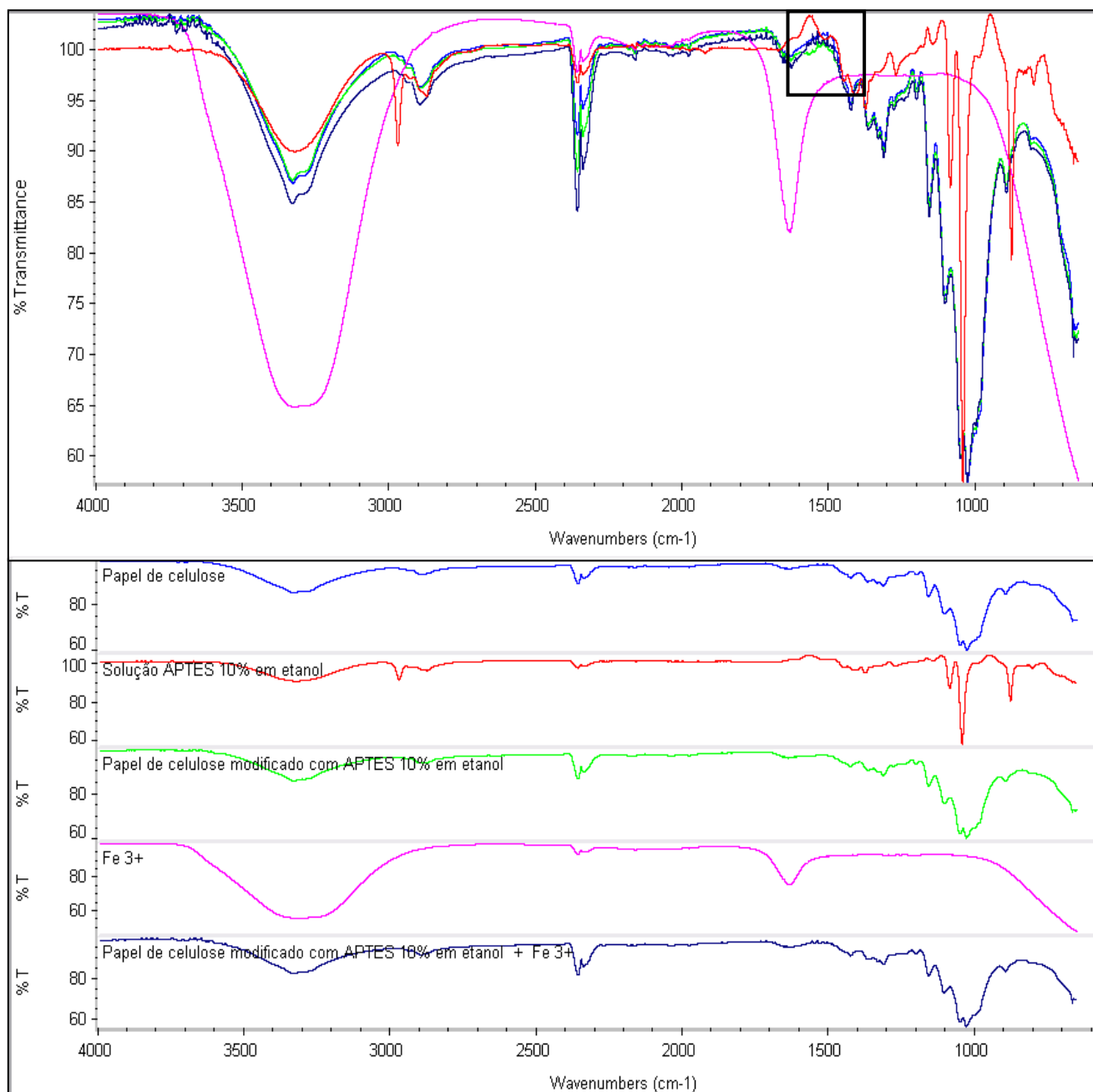


Figura B. 5- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 1 hora. Visualização da ligação do Fe^{3+} ao APTES 10% em etanol.

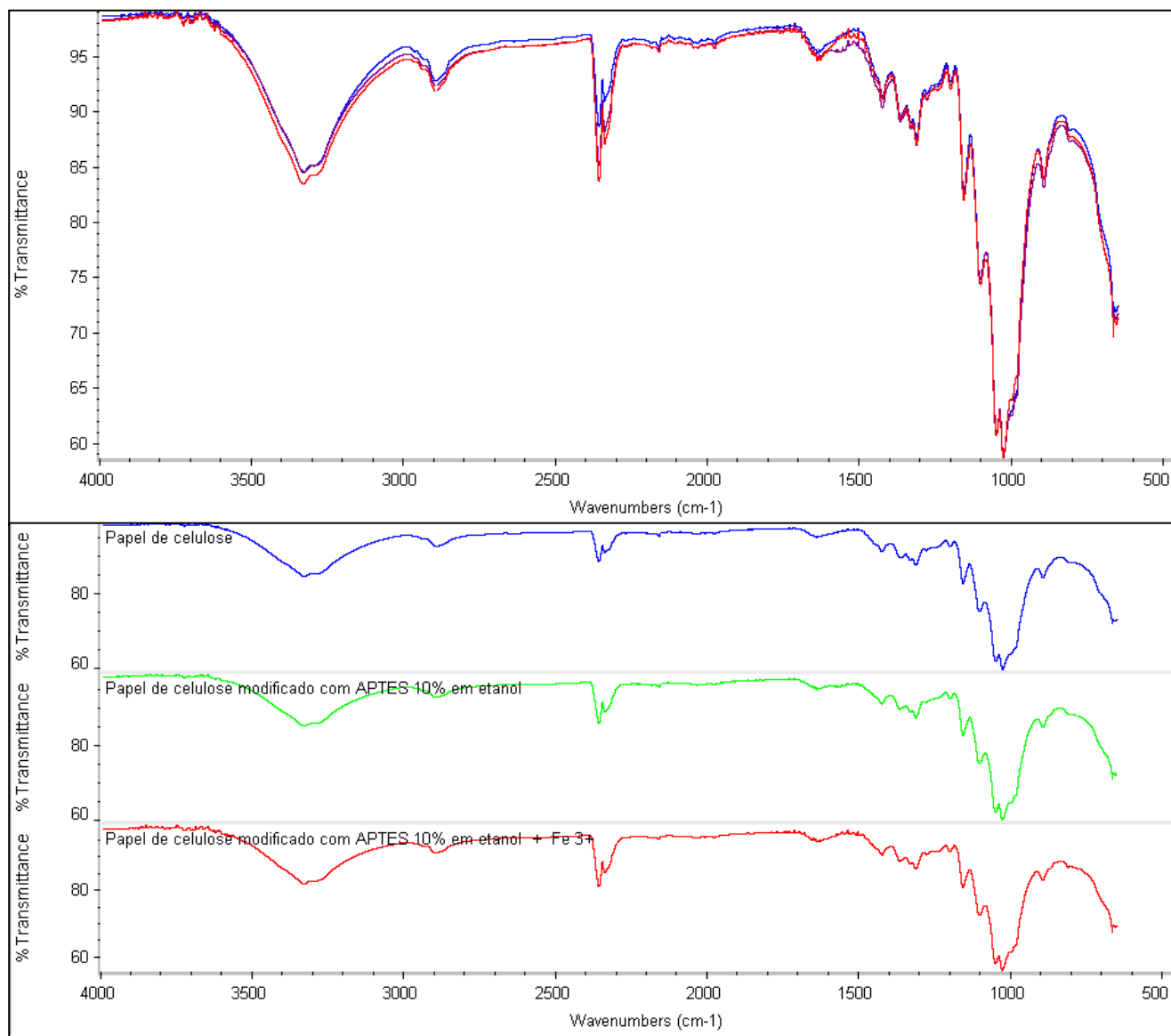


Figura B. 6- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 1 hora (espécie metálica Fe³⁺)

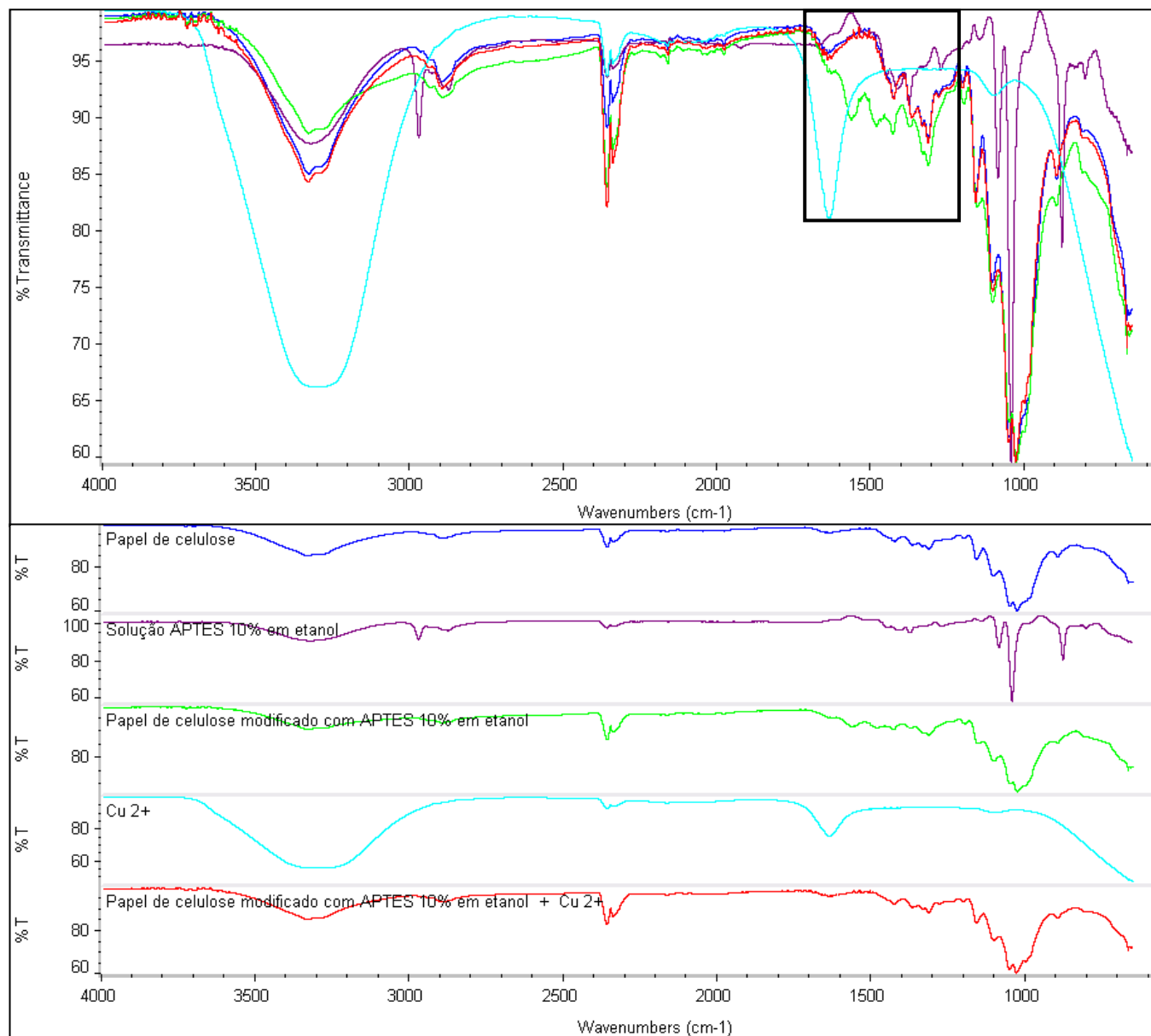


Figura B. 7- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 2 horas. Visualização da ligação do Cu^{2+} ao APTES 10% em etanol.

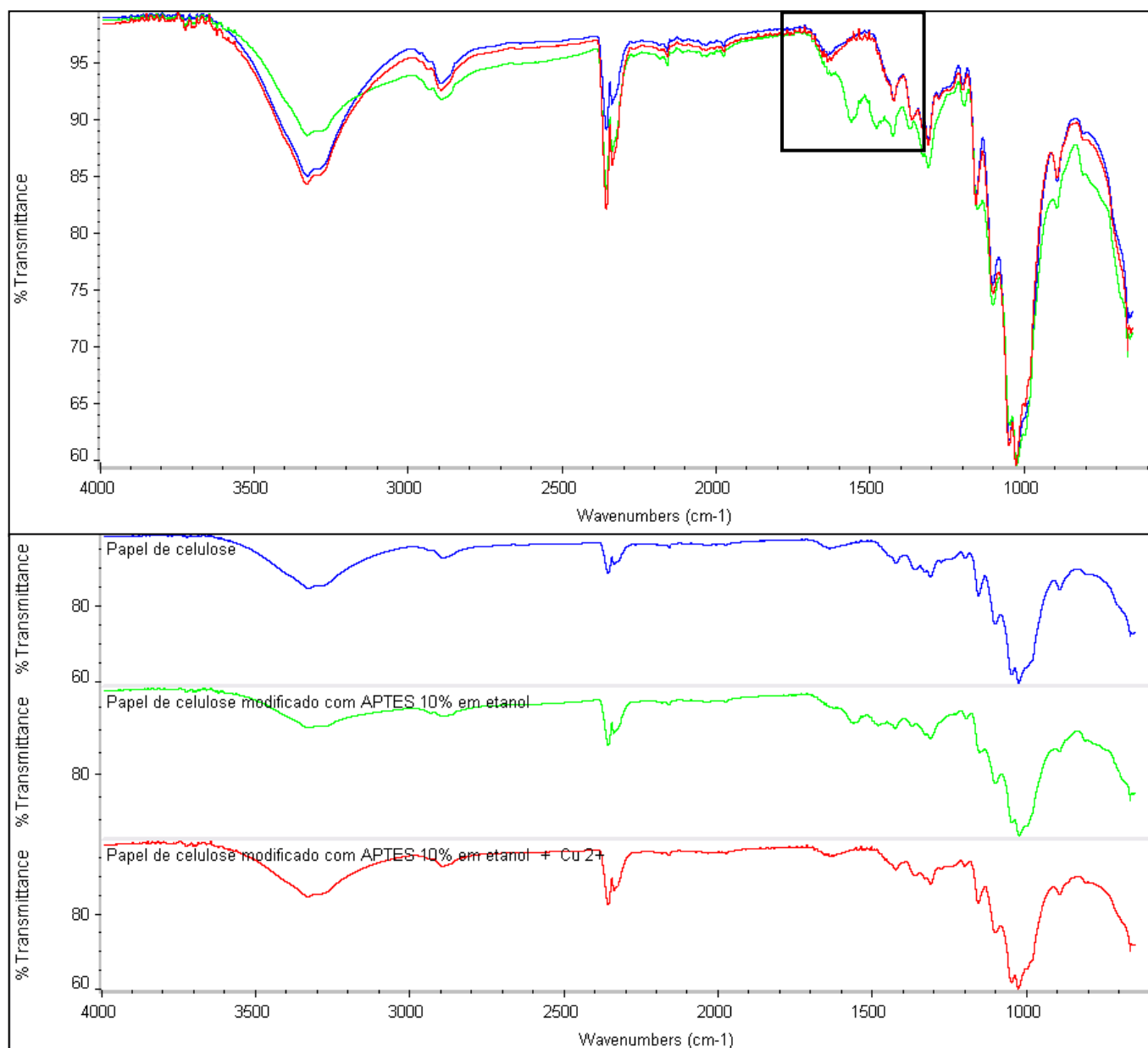


Figura B. 8- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 2 horas (espécie metálica Cu²⁺)

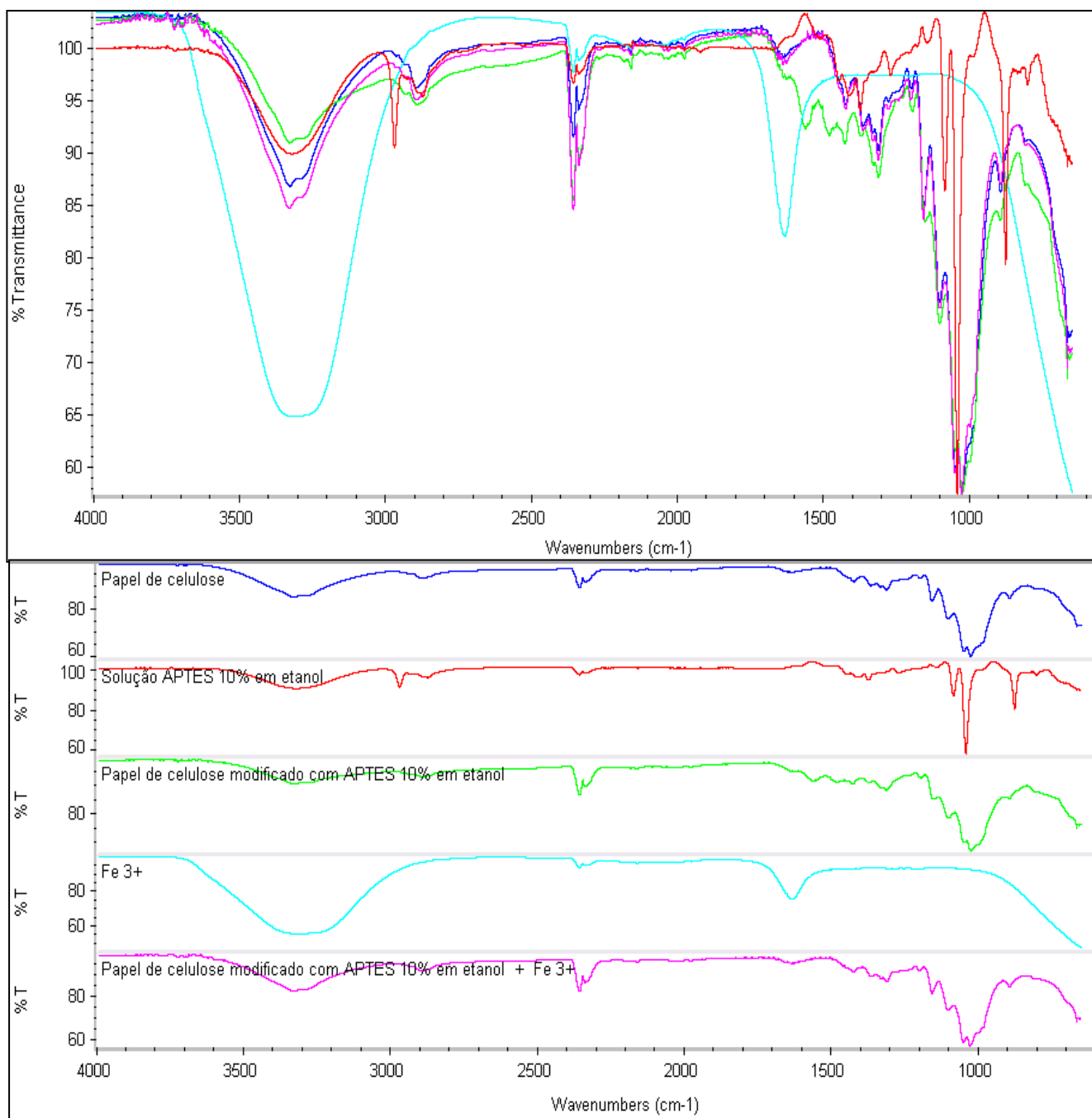


Figura B. 9- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 2 horas. Visualização da ligação do Fe^{3+} ao APTES 10% em etanol.

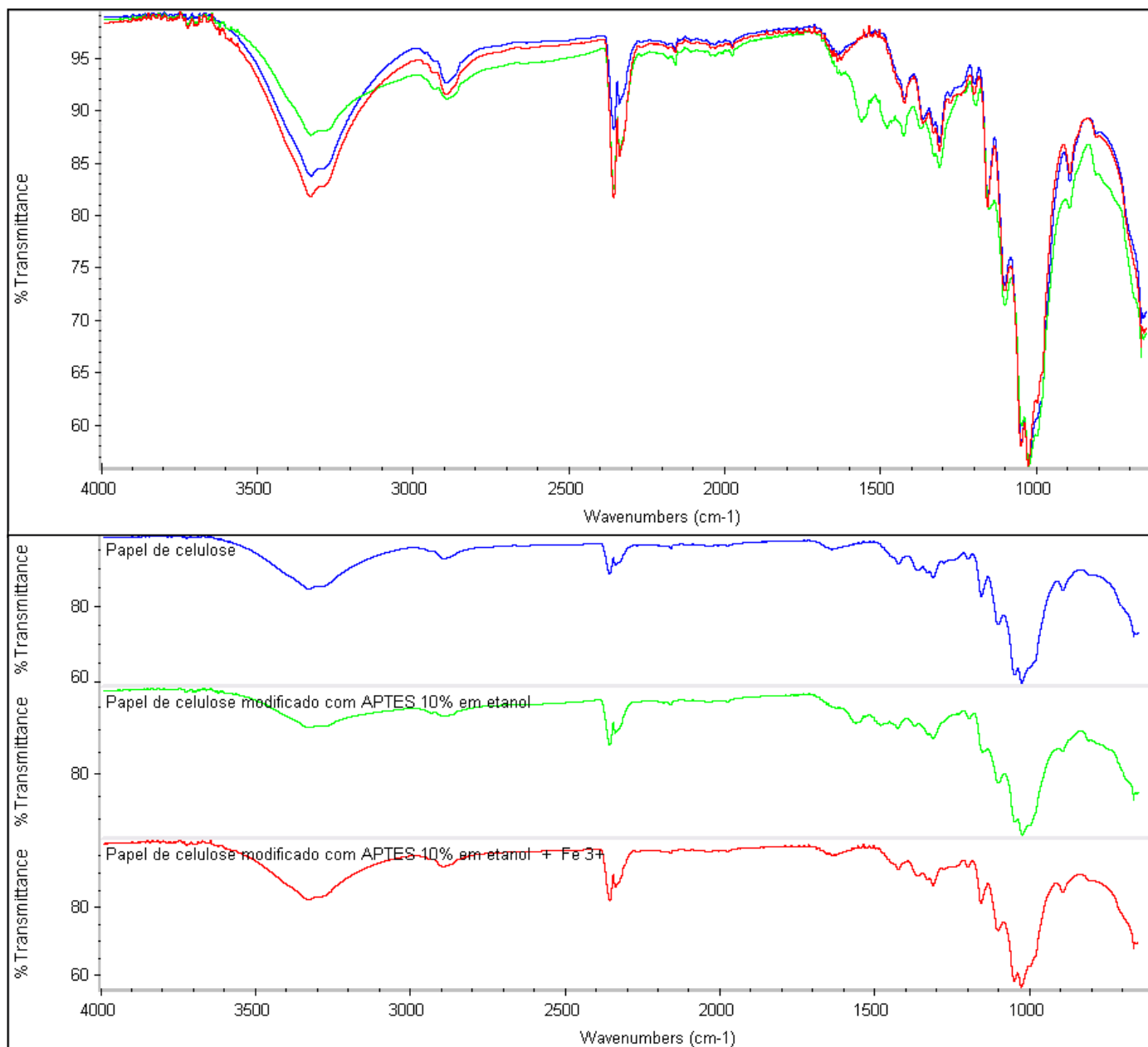


Figura B. 10- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 2horas (espécie metálica Fe^{3+})

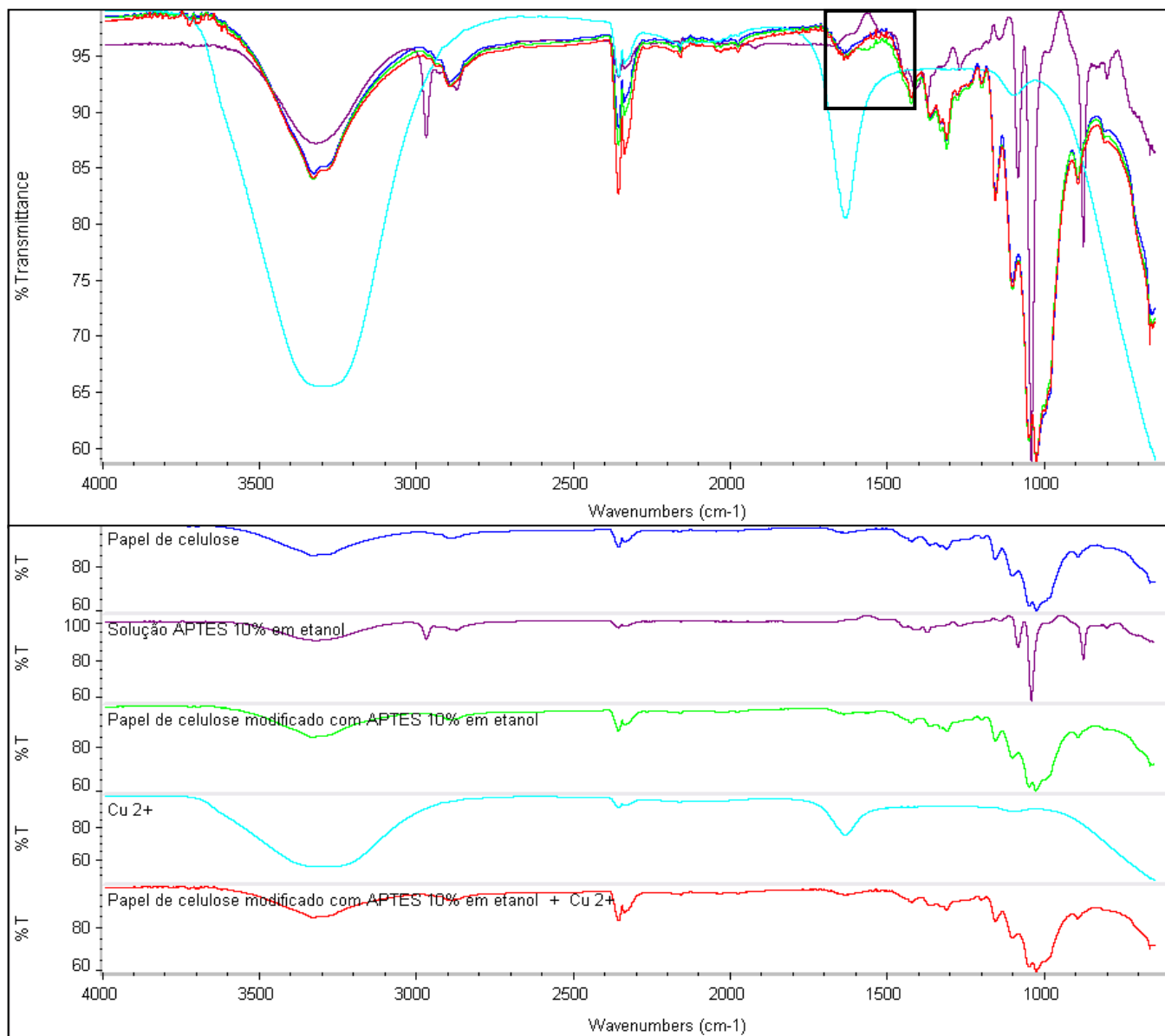


Figura B. 11- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 3 horas. Visualização da ligação do Cu²⁺ ao APTES 10% em etanol.

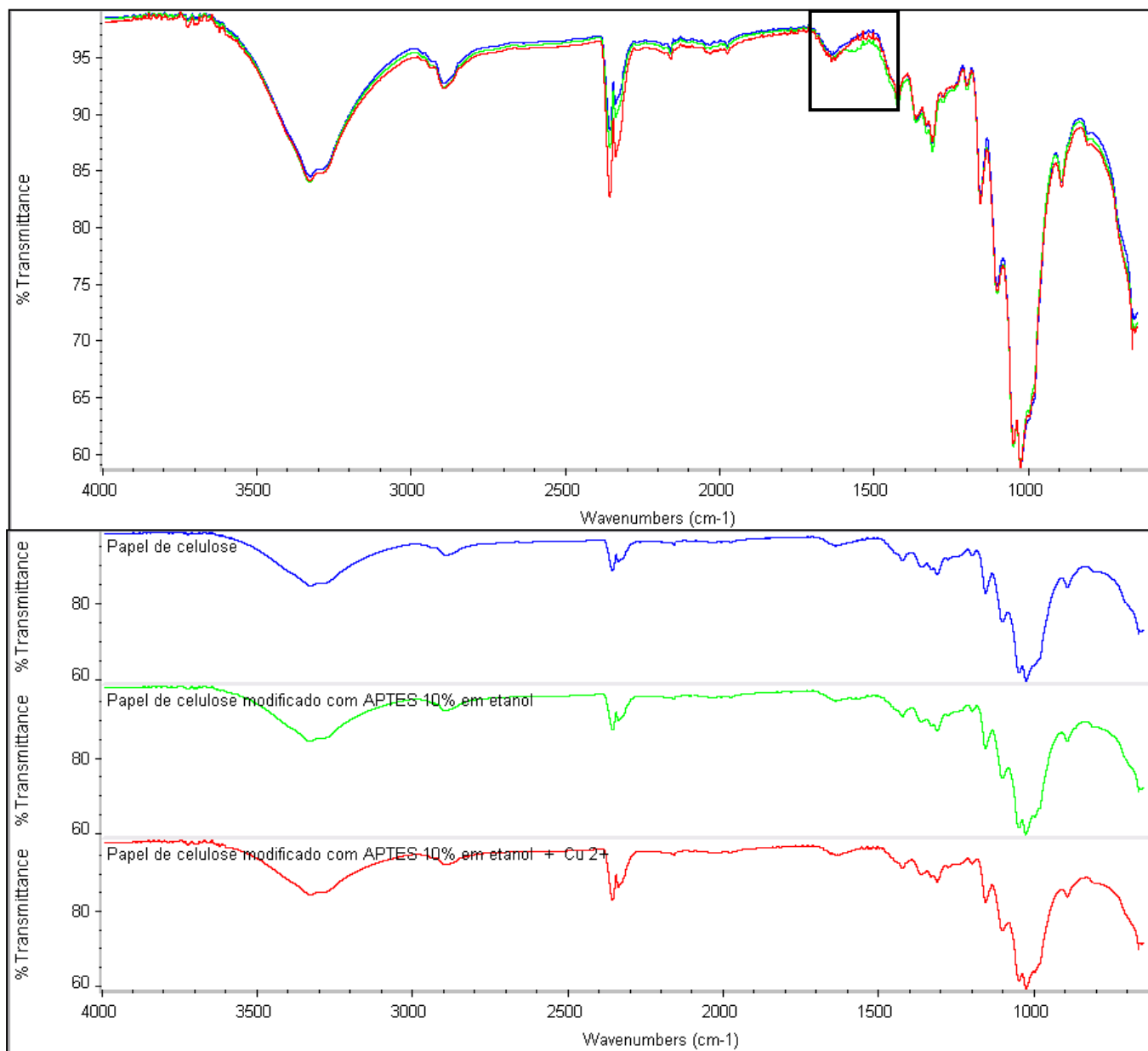


Figura B. 12- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 3 horas (espécie metálica Cu²⁺)

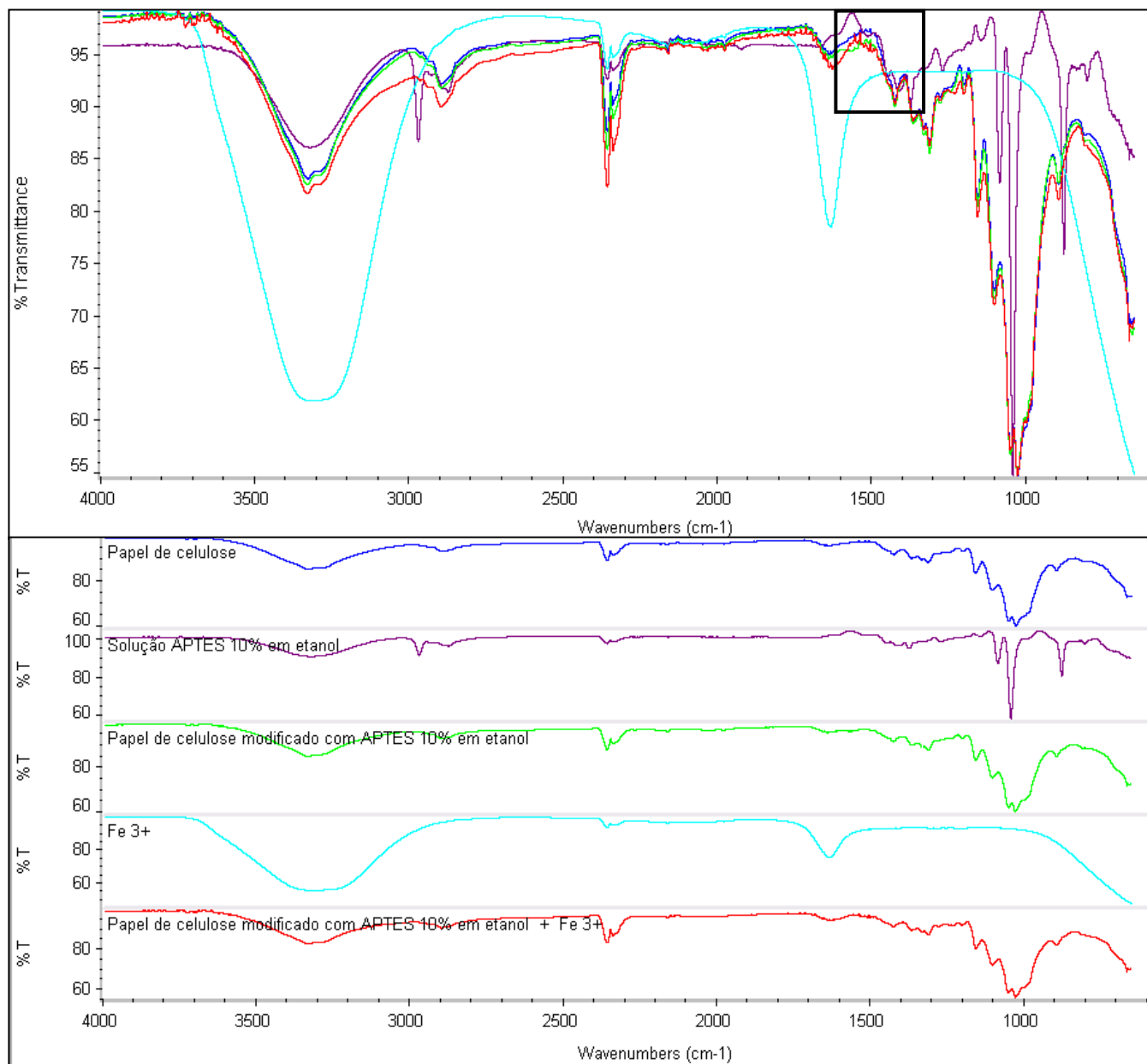


Figura B. 13- Espectros das várias etapas da criação do sensor para o tempo de reação entre o APTES/etanol e o papel de celulose de 3 horas. Visualização da ligação do Fe³⁺ ao APTES 10% em etanol.

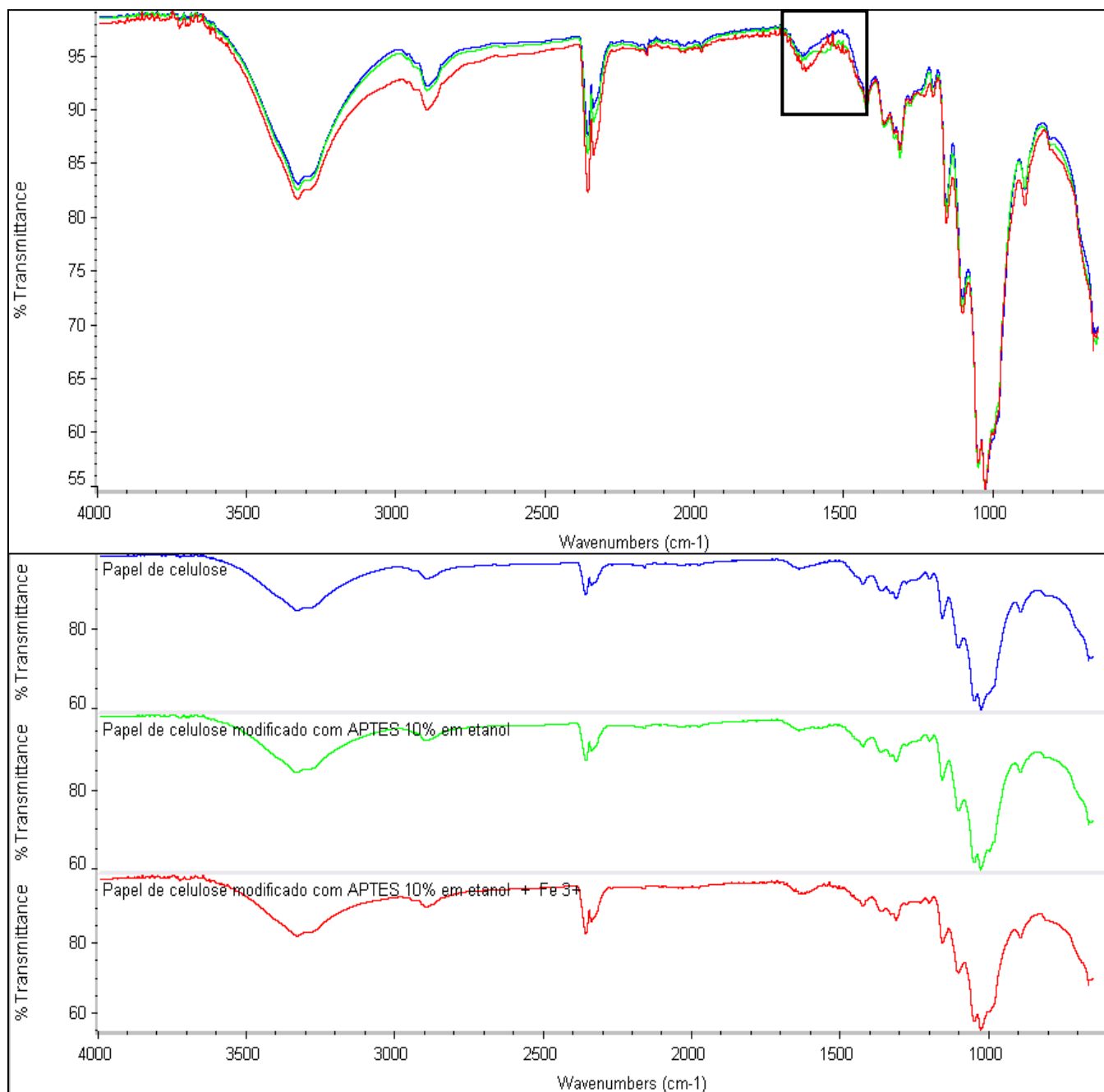


Figura B. 14- Espectros relativos às várias modificações ocorridas no papel de celulose para a reação entre o papel de celulose e o APTES/etanol de 3 horas (espécie metálica Fe³⁺)

Anexo C.

Imagens obtidas através da digitalização num scanner

Tabela C. 1- Evolução da cor do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo, através de imagem obtida por digitalização.

Concentração de Oxitetraciclina	$1,0 \times 10^{-3}$ M	$5,0 \times 10^{-4}$ M	$1,0 \times 10^{-4}$ M	$5,0 \times 10^{-5}$ M	$1,0 \times 10^{-5}$ M	$5,0 \times 10^{-6}$ M
Papel de celulose sem antibiótico						
Papel de celulose com antibiótico						

Tabela C.1- Evolução da cor do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo, através de imagem obtida por digitalização (*continuação*).

Concentração de Oxitetraciclina	$1,0 \times 10^{-6}$ M	$5,0 \times 10^{-7}$ M	$1,0 \times 10^{-7}$ M	$5,0 \times 10^{-8}$ M	$1,0 \times 10^{-8}$ M	$5,0 \times 10^{-9}$ M
Papel de celulose sem antibiótico						
Papel de celulose com antibiótico						

Tabela C. 2- Coordenadas de cor dos sensores APTES/etanol/Cu²⁺ em diferentes concentrações de OXI, obtidas a partir de imagens obtidas por digitalização.

OXI, mol/L	Tonalidade	Brilho/Luminosidade	Saturação	Tonalidade + Luminosidade
—	121±1,5275	169±3,2146	90±8,021	211
1,0×10 ⁻³	97±4,0415	163±6,6583	102±18,61	288
5,0×10 ⁻⁴	104±3,0551	165±6,2449	81±5,2915	296
1,0×10 ⁻⁴	121±1	177±7,5056	85±10,58	290
5,0×10 ⁻⁵	123	163±4,5826	94±11,37	287
1,0×10 ⁻⁵	124±0,57735	157±2,3094	109±3,606	294
5,0×10 ⁻⁶	123±1,1547	174±7,3711	118±12,22	284
1,0×10 ⁻⁶	124±1	160±11,3725	101±17,32	297
5,0×10 ⁻⁷	122±1	172±1,5275	87±8,717	281
1,0×10 ⁻⁷	124±4,0415	163±8,7369	108±11,06	286
5,0×10 ⁻⁸	122±2,0817	168±3,2146	118±17,16	298
1,0×10 ⁻⁸	125±1	171±3,055	95±11,55	269
5,0×10 ⁻⁹	125±1	163±3	99±3,215	260

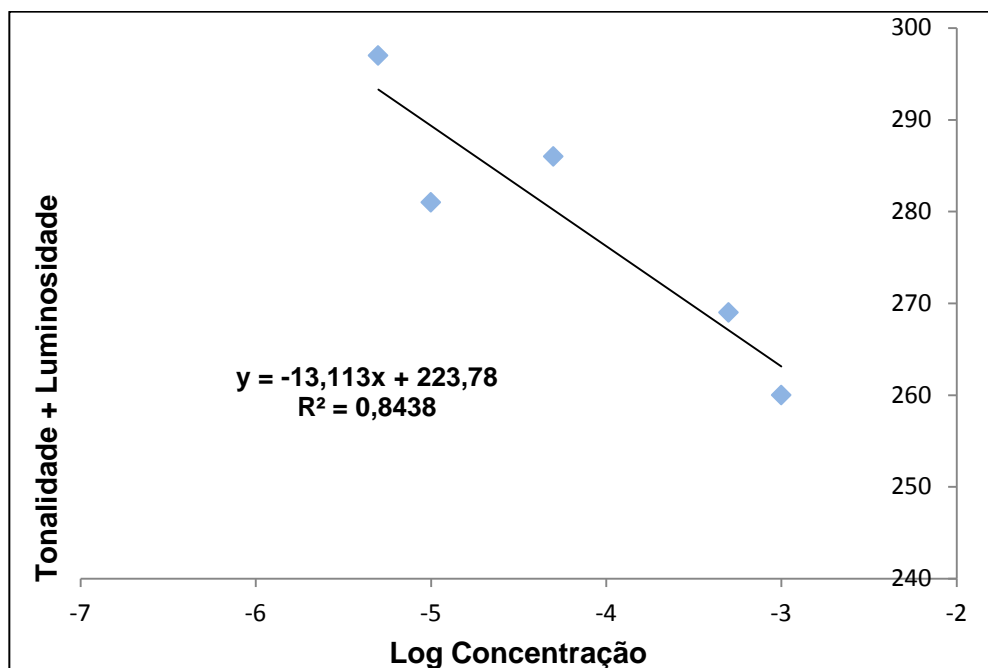


Figura C. 1- Curva de Calibração do sensor APTES/etanol/ Cu^{2+} para as imagens obtidas por digitalização.

Tabela C. 3- Evolução da cor do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo, através de imagem obtida por digitalização.

Ensaio	OXI, mol/L					
	$1,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6}$
Sem OXI	[Imagem de controlo negativo]					
Com OXI	[Imagem]	[Imagem]	[Imagem]	[Imagem]	[Imagem]	[Imagem]

Tabela C.3- Evolução da cor do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} com a concentração de OXI e o respetivo controlo negativo, através de imagem obtida por digitalização (*continuação*).

Ensaio	OXI, mol/L					
	$1,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-9}$
Sem OXI	[Imagem de controlo negativo]					
Com OXI	[Imagem]	[Imagem]	[Imagem]	[Imagem]	[Imagem]	[Imagem]

Tabela C. 4- Coordenadas de cor dos sensores APTES/etanol/Fe³⁺ em diferentes concentrações de OXI, obtidas a partir de imagens obtidas por digitalização.

OXI, mol/L	Tonalidade	Brilho/Luminosidade	Saturação	Tonalidade + Luminosidade
—	20	136	137	157
1,0×10 ⁻³	20±2,5166	113±2,082	141±0,5774	133
5,0×10 ⁻⁴	19±2,5166	114±8,888	142±6,0828	133
1,0×10 ⁻⁴	18±0,5774	128±5	134±4,3589	146
5,0×10 ⁻⁵	19±1	123±2,082	125±5,1962	142
1,0×10 ⁻⁵	20±1	119±3,055	120±5,0332	139
5,0×10 ⁻⁶	21±2,082	119±1,1547	120±5,2915	140
1,0×10 ⁻⁶	22±0,5774	140±11,24	143±10,54	162
5,0×10 ⁻⁷	22±0,5774	142±2,8868	125±0,5774	164
1,0×10 ⁻⁷	20±2	131±11,36	116±4,5826	151
5,0×10 ⁻⁸	20±1,1547	128±3,4641	129±5,0332	148
1,0×10 ⁻⁸	20±1,5275	116±9,7125	133±7,6376	136
5,0×10 ⁻⁹	22±1	126±8,5049	130±4,7258	148

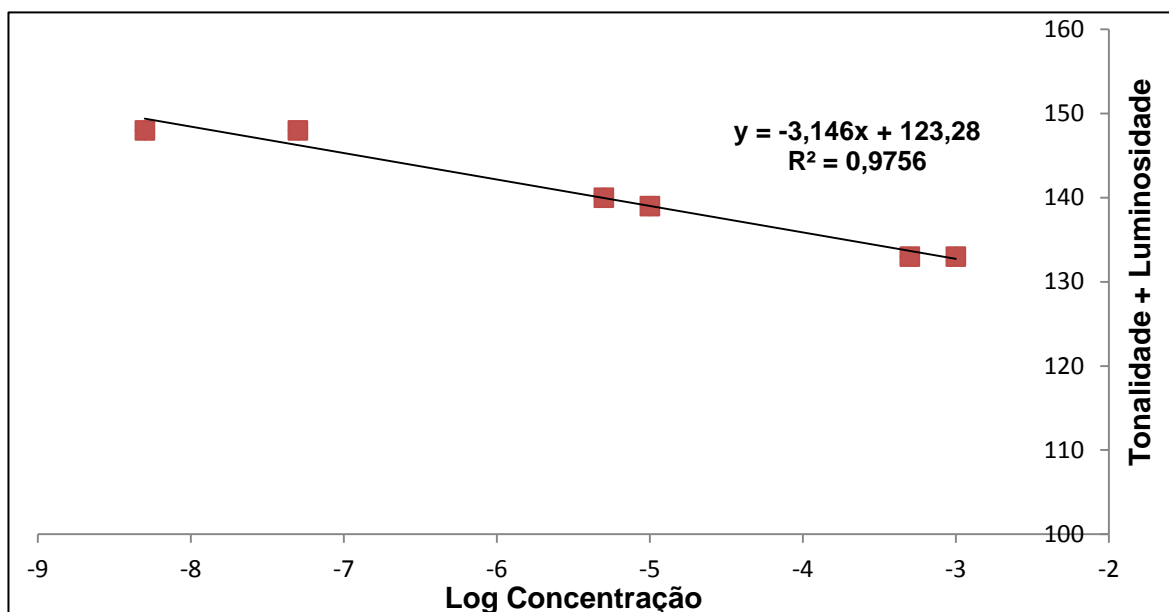


Figura C. 2- Curva de Calibração do sensor APTES/etanol/ Fe^{3+} para as imagens obtidas por digitalização.