

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição e permitiram que esta investigação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar apresento o meu agradecimento à Doutora Goreti Sales e Engenheira Felismina Moreira pela forma como orientaram este trabalho. As notas das suas orientações e a utilidade das suas recomendações foram essenciais para atingir os objectivos propostos. Tenho de agradecer a cordialidade e a disponibilidade com que me receberam ao longo destes meses de trabalho.

Gostaria de agradecer ainda ao Engenheiro Crispim, pela sua flexibilidade em aceitar este projecto como tese de Mestrado.

Tenho consciência de que a autonomia que me foi concedida durante a realização deste trabalho foi decisiva para que o mesmo contribuísse para meu desenvolvimento pessoal, desta forma queria agradecer também à Doutora Cristina Matos, por me ter recebido bem no Grupo de Reacção e Análise Química.

Finalmente, gostaria de deixar um agradecimento muito especial à minha família e namorado, pela compreensão, apoio incondicional e pelas privações a que foram obrigados para que pudesse realizar este trabalho.

RESUMO

A presente dissertação descreve o desenvolvimento e a caracterização de sensores ópticos com base em membranas de poli(cloreto de vinilo), PVC, para determinação de Norfloxacin em amostras do sector da aquacultura. Estes sensores basearam-se na reacção colorimétrica entre um metal imobilizado em PVC e a Norfloxacin. O metal foi escolhido com base em ensaios prévios de reacção colorimétrica entre a Norfloxacin e várias espécies metálicas, nomeadamente, Fe(III), Al(III), Pb(II), Aluminon, Mo(II), Mn(II), Ni(II), Cu(II), Co(II), Sn(II) e V(V). A reacção mais intensa foi obtida com o Fe(III).

Neste sentido, numa primeira fase foram desenvolvidos sensores baseados em Fe(III). O efeito de alguns parâmetros experimentais na resposta desses sensores foi avaliado de modo univariado. Incluem-se aqui o efeito do pH, avaliado entre 2,00 e 6,00, e o da concentração de Fe(III), variada entre cerca de $1,00 \times 10^{-5}$ M e $2,00 \times 10^{-4}$ M. Os melhores valores foram obtidos a pH 3, para o qual se verificou um comportamento linear entre cerca de $1,00 \times 10^{-5}$ M e $1,70 \times 10^{-4}$ M de Fe(III).

Utilizando as condições seleccionadas anteriormente, procedeu-se à caracterização do complexo sob ponto de vista químico. Os valores obtidos apontaram para a necessidade de um excesso de Fe(III) de, pelo menos, 10 vezes, no sentido de garantir a máxima extensão de complexação. O complexo referido apresentou, nestas condições, um comportamento linear ao longo do intervalo de concentrações de cerca de $7,00 \times 10^{-5}$ M a $7,00 \times 10^{-4}$ M em NOR. O complexo formado foi estável ao longo de 90 minutos.

As condições óptimas para análise desse complexo numa superfície sólida foram obtidas após avaliação do efeito da quantidade de Fe(III) e do tipo e quantidade de solvente mediador (o-nitrofenil octil éter, di-*n*-octilftalato, dibutilftalato, *bis*(etilhexil)sebacato, *bis*(etilhexil)ftalato). O *bis*(etilhexil)sebacato foi o solvente mediador escolhido e a relação de quantidade entre o PVC e o solvente mediador foi igual a 1:2.

O procedimento de preparação do sensor sólido e subsequente optimização foi aplicado a outras espécies metálicas, para além do Fe(III), tais como, Cu(II), Mn(II) e aluminon. A conjugação de todos estes metais permitiu desenvolver um *array* de sensores para despistagem de Norfloxacin em águas de aquacultura. Algumas membranas sensoras foram aplicadas com sucesso no controlo de Norfloxacin em amostras de águas ambientais dopadas. Os resultados obtidos com membranas de Fe(III) e Cu(II) foram exactos, tendo-se registado valores de concentração próximos dos reais. O método proposto permitiu, por isso, a despistagem rápida e eficaz da presença de um antibiótico em águas ambientais, permitindo ainda o seu doseamento a um baixo custo. Numa perspectiva de rotina, e tendo em vista a despistagem deste antibiótico, este método revelou-se mais rápido e mais barato do que os demais métodos descritos na literatura para este efeito.

Palavras-chave: Aquacultura, antibiótico de uso veterinário, norfloxacin, água ambiental, espectrofotometria de UV/Visível, colorimetria, sensor sólido.

ABSTRACT

This dissertation describes the development and characterization of optical sensors based on Poly (vinyl chloride), PVC, membranes for the determination of Norfloxacin in samples from the aquaculture sector. These sensors were based on the colorimetric reaction between an immobilized metal in PVC and Norfloxacin. The metal was selected after preliminary experiments between Norfloxacin and various metal species, including, Fe (III), Al (III), Pb(II), Aluminon, Mo(II), Mn(II), Ni(II), Cu(II), Co(II), Sn(II) e Vanadium. The most intense reaction was obtained for Fe (III).

Hence, the first sensors were based on Fe (III). The effect of experimental parameters in the response of these sensors was evaluated by univariate mode. These include the effect of pH, measured between 2.0 and 6.0, and the concentration of Fe (III) varying between 1.11×10^{-5} M and 2.11×10^{-4} M. The best response was obtained for pH 3, providing a linear response between 1.11×10^{-5} M and 1.67×10^{-4} M in the concentration of Fe (III).

Using the conditions previously selected, additional studies were conducted for characterization of the colored complex. The results showed the need of an excess of Fe (III) of least 10 times, to ensure a maximum degree of complexation. The complex displayed a linear behavior over the concentration range of 7.08×10^{-5} M to 7.08×10^{-4} M. The complex was found stable over 90 minutes.

The optimal conditions for analysis of this complex in a solid surface were found after studying the effect of the amount of Fe(III) and the kind/amount of plasticizer (o-nitrofenil octil eter, di-*n*-octilftalato, dibutilftalato, *bis*(etilhexil)sebacato, *bis*(etilhexil)ftalato) upon the observed color. The plasticizer selected was *bis*(ethylhexyl)sebacate and ratio amounts of PVC/plasticizer was 1:2.

The above selected procedure for preparing the solid sensor and subsequent optimization was applied to other metal species, namely Cu(II), Mn(II) and aluminon. The combination of all these metals made possible to develop an *array* of sensors for detecting Norfloxacin in aquaculture waters. The sensors have been successfully applied to screen of Norfloxacin in environmental water samples. The results were found accurate, with experimental concentrations close to the real value. Thus, the proposed method allowed the rapid and effective screening of an antibiotic in environmental water, also providing a quantitative response with low cost. For routine applications, this method was found faster and cheaper than other methods described in literature for this purpose.

Keywords: aquaculture, antimicrobial for veterinary use, norfloxacin, environmental water, UV/Vis spectrophotometry, colorimetry, solid sensor.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1. Aquacultura.....	1
1.1.1. Piscicultura Dulceaquícola	1
1.1.2. Moluscicultura em Meio Marinho	2
1.1.3. Piscicultura em Meio Marinho.....	2
1.1.4. Potencialidades da Aquacultura	3
1.1.5. Produção Mundial de Peixe.....	4
1.2. Compostos utilizados em Aquacultura.....	5
1.2.1. Parasitocidas	7
1.2.2. Coccidiostáticos e Antiprotozoários	8
1.2.3. Antifúngicos	8
1.2.4. Hormonas	8
1.2.5. Promotores de Crescimento.....	8
1.2.6. Antibióticos	9
1.3. Métodos de Análise de Antibióticos em Aquacultura	14
1.3.1. Métodos Separativos	14
1.3.2. Métodos Electroanalíticos	15
1.3.3. Métodos Ópticos.....	15
1.4. Sistemas Sensores	18
1.4.1. Sensores Ópticos.....	18
2. Descrição Experimental.....	27
2.1 Considerações Gerais.....	27
2.2 Material e Aparelhos utilizados.....	27
2.3 Reagentes.....	28
2.4 Selecção da espécie metálica e efeito do meio	28
2.5 Monitorização da cor	29
2.5.1 Em meio líquido	29
2.5.2 Em superfície sólida.....	29
2.6 Estudo do Efeito do pH.....	29
2.7 Estudo da proporção molar do Complexo	30
2.8 Estudo da Estabilidade do Complexo	30
2.9 Efeito da concentração de ferro.....	30
2.10 Efeito de espécies interferentes	30
2.11 Procedimento de preparação do sensor	31
2.12 Optimização da composição do sensor	31
2.12.1 Selecção da quantidade de Ferro.....	31
2.12.2 Selecção do Solvente Mediador	31

2.12.3	Seleccção da Quantidade de Solvente Mediador	31
2.13	Caracterização analítica do sensor sólido	31
2.14	Efeito de outros antibióticos	32
2.15	Desenvolvimento de um array	32
2.16	Aplicação à Análise de Águas	33
3.	Resultados e Discussão	35
3.1.	Seleccção da espécie metálica	35
3.2.	Efeito de pH	39
3.3.	Proporção molar do complexo	43
3.1.1.	Estudo da Estabilidade do Complexo	45
3.2.	Escolha da concentração de Fe (III)	47
3.3.	Possíveis interferentes em amostras de água	48
3.4.	Preparação do Sensor	50
3.4.1.	Quantidade de Fe(III)	50
3.4.2.	Tipo de Solvente Mediador.....	52
3.4.3.	Quantidade de Solvente Mediador	54
3.5.	Caracterização analítica do sensor óptico	55
3.6.	Interferência de outros antibióticos.....	57
3.7.	Preparação de um <i>array</i> de sensores.....	58
3.8.	Análise das Amostras Biológicas.....	62
3.9.	Análise Técnico-Económica	65
4.	Conclusão.....	67
5.	Bibliografia	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estimativa mundial da produção de aquacultura.[5].....	5
Figura 2	CAP e seus análogos: CAP diacetato (CAP-DA) e tianfenicol (TAP) [14].	11
Figura 3	Tetraciclina e seus análogos: TC (tetraciclina), CTC (clortetraciclina), OTC (oxitetraciclina), DC (doxitetraclina), ETC (epiclortetraciclina)e ATC (anidrotetraciclina).	12
Figura 4	Estrutura química da nitrofurantoina (NFA) e da nitrofurazona (NFZ).	12
Figura 5	Estrutura molecular de fluorquinolonas e quinolonas: ciprofloxacina (CP), enofloxacina (ENO), NOR, enrofloxacina (ENR). [34].	13
Figura 6	Uma secção do espectro de energia electromagnética que mostra a escala de comprimento de onda correspondendo ao espectro visível [62].	17
Figura 7	Espectro visível [62].	19
Figura 8	Diagrama simplificado de uma secção do olho humano [64].	20
Figura 9	Cores primárias (A) e secundárias (B) [63].	21
Figura 10	Representação do Espaço de Cor [66].	22
Figura 11	Tonalidade, Luminosidade e Saturação [67].	23
Figura 12	Espaço de cor YXZ.	24
Figura 13	Espaços de cor CIELab [68].	25
Figura 14	Variação do valor da absorvância da solução de complexo e de Fe(III) e a sua diferença em função da concentração de Fe(III), para soluções a diferentes valores de pH.	41
Figura 15	Proporção molar de NOR:Fe (III), 1:1.	44
Figura 16	Regressão linear entre $[\log(Aa-Ax)/(Ax-Ao)]$ e $\log [Fe (III), M]$	45
Figura 17	Diferença entre a absorvância do complexo e a absorvância de Fe (III) para os tempos t_0 , t_1 e t_2 , referentes ao dia 19.11.2010 (esquerda) e para os tempos t_3 , t_4 , referentes ao dia 20.11.2010	46
Figura 18	Representação gráfica do valor de absorvâncias obtido para a diferença entre a absorvância do complexo e a absorvância de Fe(III) para diferentes concentrações de NOR.	48
Figura 19	Membranas sensoras de PVC com diferentes quantidades de ferro, antes e depois da aplicação da solução de antibiótico e réplicas correspondentes.	51
Figura 20	Membranas sensoras de PVC com diferentes solventes mediadores, antes e depois da aplicação da solução de antibiótico e réplicas correspondentes.	53
Figura 21	Membranas sensoras de PVC com diferentes quantidades de BES, antes e depois da aplicação da solução de antibiótico.	54
Figura 22	– Gradiente de coloração para a curva de calibração de NOR com as membranas sensoras seleccionadas.	56
Figura 23	Curva de calibração para o sensor otimizado.	57
Figura 24	Coloração de cada sensor após deposição de várias soluções interferentes em placa e a composição da imagem em Paint para comparação visual da cor.	58
Figura 25	Array de sensor óptico base	59
Figura 26	Membranas sensoras de PVC com diferentes solventes mediadores, antes e depois da aplicação da solução de antibiótico e réplicas correspondentes.	59
Figura 27	Curva de calibração para o sensor de Fe(III), aluminon, Cu(II) e Mn(II), utilizando em ordenada a tonalidade e luminosidade ou apenas a luminosidade.	61
Figura 28	Imagem da deposição de água contaminada nas membranas desenvolvidas.	62
Figura 29	Curva de calibração para o array de sensores.	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Substâncias farmacologicamente activas de utilização veterinária [6].	6
Tabela 2	Resultados das misturas de catiões com o antibiótico NOR.	37
Tabela 3	Valores de absorvância obtidos a pH 2, 3, 4, 5 e 6, para a solução de complexo Fe(III) / NOR e para a solução de Fe(III) e sua diferença.	40
Tabela 4	Parâmetros analíticos relativos à variação da diferença de absorvância entre o complexo corado e o Fe(III), obtida a vários valores de pH.	42
Tabela 5	Valores de absorvância obtidos para a solução de complexo Fe(III) / NOR e para a solução de Fe(III) e sua diferença.	43
Tabela 6	Valores obtidos pelo tratamento matemático imposto aos resultados obtidos no estudo de proporção molar do complexo.	44
Tabela 7	Valores das absorvâncias obtidas para a diferença entre a absorvância do complexo e a absorvância de Fe(III) ao longo do tempo.	46
Tabela 8	Valores de absorvância obtidos para a diferença entre as absorvâncias das soluções de complexo e de metal, com uma concentração em Fe(III) igual a $1,20 \times 10^{-2}$ M (A), $1,33 \times 10^{-3}$ M (B) ou $3,84 \times 10^{-4}$ M (C).	47
Tabela 9	Valores do erro relativo para a análise de interferentes.	49
Tabela 10	Composição de membranas preparadas com quantidades de Fe(III) variáveis.	50
Tabela 11	Gradiente de coloração verificado pela deposição de diferentes concentrações de NOR em cada uma das membranas, preparadas com quantidades de ferro crescentes.	52
Tabela 12	Composição de membranas preparadas com diferentes solventes mediadores.	53
Tabela 13	Composição de membranas preparadas com diferentes quantidades de BES.	54
Tabela 14	Gradiente de coloração verificado pela deposição de diferentes concentrações de NOR em cada uma das membranas, preparadas com quantidades de BES crescentes.	55
Tabela 15	Composição mássica das membrana sensore selecionada.	55
Tabela 16	Valores das coordenadas de cada um dos sensores.	56
Tabela 17	Dados para preparação das soluções de antibiótico interferente.	57
Tabela 18	Valores das coordenadas do sistema HSL para os vários antibióticos interferentes.	58
Tabela 19	Gradiente de cloração para cada um dos sensores do array.	60
Tabela 20	Valores das coordenadas de cor referente ao sensores de Fe(III), aluminon, Cu(II) e Mn(II).	60
Tabela 21	Preparação do sensor nas condições óptimas.	62
Tabela 22	Valores das coordenadas de cor referente ao sensor de Fe(III), aluminon, Cu(II) e Mn(II).	62
Tabela 23	Gradiente de coloração no array e amostras contaminadas com NOR.	63
Tabela 24	Gastos de calibração e análise de 4 amostras.	66

ABREVIATURAS

AHD Aminohidantoina

Al(III) Alumínio (III)

ATC Anidrotetraciclina

Ba(II) Bário (II)

BEF Bis(etilhexil)ftalato

BES Bis(etilhexil)sebacato

CAP Cloranfenicol

CAP-DA Cloranfenicol (diacetato)

Cd(II) Cádmio (II)

Co(II) Cobalto (II)

CP Ciprofloxacina

CTC Clortetraciclina

DBF Dibutilftalato

DBP Dibutilftalato

DC Doxiciclina

DOF Di-n-octilftalato

EC Electroforese capilar

ENO Enoxifloxacina

ENR Enrofloxacin

ETC Epiclortetraciclina

Fe(III) Ferro (III)

FGE Fenil glicileter

FQs Fluorquinilonas

Hg(II)	Mercúrio (II)
LMR	Limite Máximo de Resposta
Lum	Luminosidade
MEV	Semicarbazida
Mn (II)	Manganês (II)
Mo (II)	Molibdato (II)
NFA	Nitrofurantoína
NFZ	Nitrofurazona
Ni (II)	Níquel (II)
NOR	Norfloxacin
ONFOE	2-Nitrofenil octil éter
OTC	Oxitetraciclina
Pb (II)	Chumbo (II)
PVC	Poli(cloreto de Vinilo)
Sat	Saturação
Sn (II)	Estanho (II)
TAP	Tianfenicol
TC	Tetraciclina
Ton	Tonalidade
UV-Vis	UV-V�sivel
V (V)	Vanádio (V)
Zn (II)	Zinco (II)

1. INTRODUÇÃO

1.1. AQUACULTURA

A aquacultura é uma actividade muito diversa abrangendo uma gama bastante alargada de espécies, sistemas e práticas. A dimensão económica do sector contribui para a criação de novos nichos económicos, isto é, para a criação de emprego, para uma utilização mais eficiente dos recursos locais e para a criação de oportunidades de investimento produtivo. A contribuição para o comércio, a nível local e internacional, está também a aumentar [1].

Entende-se por “aquicultura” a exploração ou cultura de organismos aquáticos que aplique técnicas concebidas para aumentar, além das capacidades naturais do meio, a produção dos organismos em causa; estes organismos continuam, durante toda a fase de exploração ou cultura até, inclusive, à sua colheita, a ser propriedade de uma pessoa singular ou colectiva [1].

A aquacultura da União abrange essencialmente 3 subsectores principais, com antecedentes e características diferentes, que são: a piscicultura dulceaquícola, moluscicultura em meio marinho e piscicultura em meio marinho [1].

1.1.1. PISCICULTURA DULCEAQUÍCOLA

A piscicultura dulceaquícola trata-se de uma actividade tradicional que tem de fazer face ao problema do valor de mercado relativamente baixo dos seus produtos em comparação com os custos de produção. A truta é a principal espécie aquícola da União. Há muitas espécies

que poderiam ser cultivadas, mas que se confrontam com o problema de uma procura muito limitada. Não é provável que a procura de peixe de água doce aumente muito num futuro próximo, a menos que sejam tomadas iniciativas de marketing que mudem a tendência actual. Na maior parte dos casos, o peixe de água doce é criado em sistemas intensivos, pelo que as restrições ambientais são importantes [2].

1.1.2. MOLUSCICULTURA EM MEIO MARINHO



A moluscicultura consiste na cultura de moluscos bivalves em viveiros e representam mais de 60% do volume, mas apenas 30% do valor da aquacultura da União. Este subsector está espalhado por toda a orla costeira da União e pode ser extremamente importante a nível local, em termos económicos e de criação de emprego. Trata-se de uma actividade tradicional, relativamente antiga, praticada com frequência nas pequenas instalações tecnicamente simples de empresas familiares. Essas empresas, em regra geral, utilizam técnicas adequadas de forma a criar maior variedade de espécies. É uma actividade em que os alimentos não se incluem entre os factores de produção, já que os moluscos das explorações aquícolas se alimentam dos recursos naturais; no entanto, podem surgir dificuldades relacionadas com flutuações da oferta, na medida em que a produção de crustáceos e moluscos está dependente das condições climáticas. A rentabilidade também é afectada pelo fenómeno cada vez mais frequente das fluorescências de algas tóxicas ou por problemas ecológicos específicos, a nível local [2].

1.1.3. PISCICULTURA EM MEIO MARINHO

A piscicultura em meio marinho é a actividade mais recente, iniciada na década de setenta, e também a mais complexa sob o ponto de vista técnico. Até ao início da década de noventa a piscicultura em meio marinho era mais rentável do que qualquer outro subsector da aquacultura, pelo que atraiu novos investidores, tendo como consequência um crescimento rápido da produção que esteve na origem de dificuldades de comercialização e de descidas dos preços. Este subsector é também afectado por problemas ambientais frequentemente relacionados com os métodos de piscicultura intensiva utilizados, em que os peixes são alimentados com alimentos industriais. Nos últimos 15 anos a criação de robalos e de douradas no Mediterrâneo desenvolveu-se rapidamente.

Outros produtos aquícolas da União são os crustáceos e as algas, que são produzidos, porém em quantidades marginais. As algas têm talvez potencialidades de expansão futura [2].

1.1.4. POTENCIALIDADES DA AQUACULTURA

O aumento da concorrência global e o crescimento de novas formas de pensar por parte dos consumidores, em termos de qualidade alimentar, levaram a que novas oportunidades de negócio surgissem na área da pesca. A crescente pressão por parte dos ecologistas em produções naturais, biodinâmicas e ecológicas leva a que as instituições comunitárias, devido ao problema da escassez de recursos naturais e empobrecimento da biodiversidade, promovam alterações de comportamentos e criem novas soluções sustentáveis para o sector.

O reforço da competitividade salvaguardando valores ambientais, a busca de maior qualidade e melhores condições de vida, entre outros, fez emergir uma nova abordagem: a Aquacultura, uma alternativa às formas tradicionais de abastecimento de pescado. Fundamenta-se assim uma estratégia em que se procura aumentar a capacidade produtiva do sector das pescas, fornecendo produtos de qualidade, promovendo o bem-estar animal e não esquecendo actividades de monitorização, investigação e promoção de tecnologias limpas.

A aquacultura é, simultaneamente, um sector tradicional e moderno, que permite a produção de plantas (algas e outras espécies similares) e animais aquáticos (peixes, crustáceos, moluscos, etc.) nas diferentes fases de desenvolvimento dos seus ciclos biológicos, em condições controladas de crescimento e repovoamento, em água salgada ou doce e evitando os efeitos nefastos que acarreta a selecção do meio natural.

O grande objectivo da Aquacultura é o fornecimento, para mercados e outras unidades comerciais, de peixe fresco e de qualidade durante todo o ano, respeitando a Natureza, valorizando os valores ambientais, promovendo a equidade de recursos face às gerações vindouras e procurando criar um ordenamento territorial do litoral que permita um desenvolvimento sustentável.

As grandes vantagens deste tipo de produção são as seguintes:

- Controlar parasitas, predadores (caranguejos, aves, etc.), competidores e poluentes pela utilização de um sistema sustentável;
- Exigir um rígido controlo sanitário, bem como um reforço do controlo da presença de resíduos nos produtos de Aquacultura;
- Planear o calendário do processo da pré e pós-colheita;

- Controlar a dieta alimentar das espécies, numa primeira fase, em zooplâncton e, numa segunda fase, num granulado de farinha feito à base de peixes e vegetais (alimentos inertes);
- Permitir o uso da tecnologia em função da biologia e da produção, da forma mais eficiente e com o mínimo impacto sobre o meio;
- Estar sujeita a um elevado controlo por parte das autoridades governamentais e outras entidades certificadas de regulação;
- Permitir a criação de espécies de maior qualidade comparativamente às criadas nos seus meios naturais, com os seus habitats intensamente poluídos.

Tratando-se de uma alternativa às espécies provenientes do meio aquático natural, este tipo de produção acaba por proteger as reservas naturais em perigo e assumir também uma dimensão importante ao nível social, contribuindo económica e socialmente para o desenvolvimento de muitas zonas rurais.

Noutra perspectiva, a maior preocupação por parte dos consumidores em alimentos de elevada qualidade e que lhes confirmem segurança alimentar, faz com que a procura por peixe do mar diminua (fruto do *habitat* poluído em que estes se desenvolvem) e seja substituída por peixe produzido em sistemas de Aquacultura.

A Aquacultura tem três variantes fundamentais:

- Criação de ovos embrionados através de uma unidade de reprodução;
- Simples *policultura* extensiva de engorda de *alevins* (peixe que sai do ovo e que se alimenta de *zooplâncton*);
- Aquacultura intensiva ou industrial feita em tanques ou outro tipo de viveiros.

Para o seu desenvolvimento, existem diferentes técnicas de produção que passam pelo aproveitamento das condições naturais (nomeadamente através da colocação de redes ou gaiolas no mar) ou pela construção de *habitats* artificiais (como por exemplo, através da construção de tanques).

Como cada espécie de peixe se desenvolve num meio com características específicas (de iluminação, quantidade e qualidade correcta de alimentos, temperatura, salubridade da água, quantidade de oxigénio dissolvido na água, etc.), a escolha da(s) espécie(s) a produzir terá que seguir uma selecção criteriosa e, preferencialmente, baseada em conhecimentos científicos, bem como no potencial de utilização comercial da(s) mesma(s) [3].

1.1.5. PRODUÇÃO MUNDIAL DE PEIXE

A aquacultura encontra-se em grande desenvolvimento a nível mundial (Figura 1). Desde 1970, a produção global de aquacultura, incluindo as plantas aquáticas, teve um

crescimento anual de 9%, alcançando cerca de 66.7 milhões de toneladas em 2006. Este crescimento foi maior do que em qualquer outro sistema de produção alimentar, apesar de ser ainda necessária uma expansão maior no sentido de dar resposta à crescente procura de peixe [4].

Em 2006 a aquacultura representou cerca de 36% do volume e 50% do valor global de peixes, incluindo fontes não alimentares. Em termos de produção alimentar, forneceu cerca de 47% dos alimentos produzidos em sistemas aquáticos, oceanos e lagos [4].

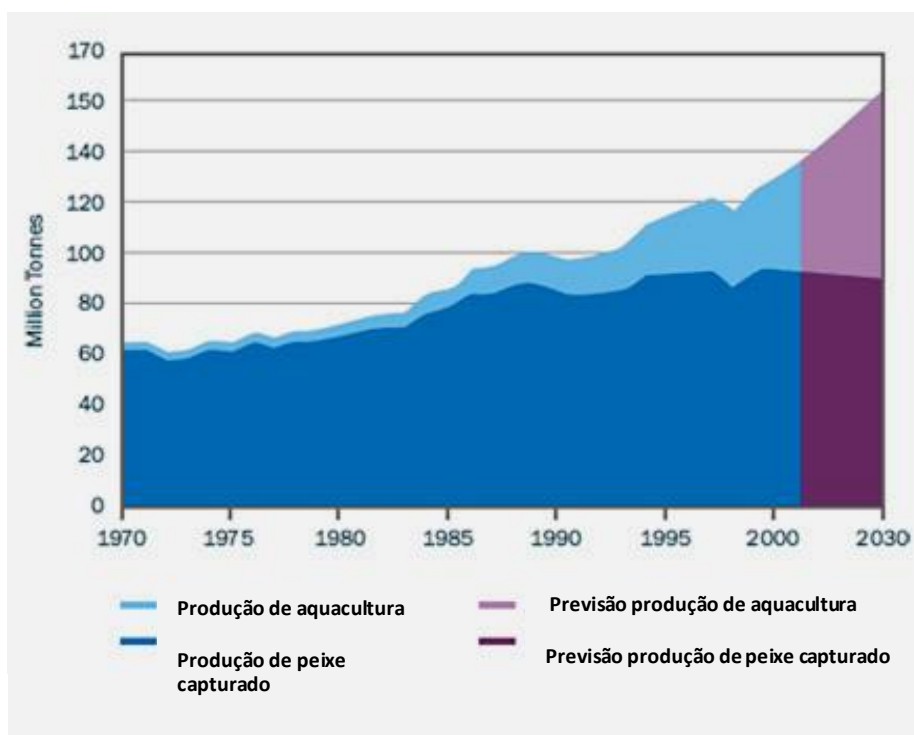


Figura 1 - Estimativa mundial da produção de aquacultura.[5].

Prevê-se que em 2030 as necessidades globais de peixe atinjam 150-160 milhões de toneladas. No entanto, para se conseguir uma base sustentável, a pesca só poderá fornecer cerca de 80-100 milhões de toneladas por ano sendo o acréscimo promovido pela aquacultura de 50-80 milhões de toneladas de peixe. Estes elevados valores de produção, só podem, porém, ser alcançados mediante um controlo rigoroso das condições de cultivo, requerendo quase sempre a intervenção de produtos farmacêuticos autorizados para o ramo veterinário [4].

1.2. COMPOSTOS UTILIZADOS EM AQUACULTURA

São utilizados em aquacultura uma vasta gama de compostos químicos, incluindo antibióticos, parasiticidas, pesticidas, hormonas, anestésicos, vários pigmentos, minerais e vitaminas. Os compostos utilizados variam muito de sector para sector, tabela1. Por

exemplo, sistemas de produção de peixes ósseos necessitam, normalmente, de uma vasta gama de produtos químicos, enquanto os sistemas de moluscos raramente utilizam estes produtos. As preocupações actuais acerca do uso de produtos químicos centram-se nos seus efeitos potenciais na saúde humana e no ecossistema natural.

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

Tipo de Composto	Exemplos de Compostos	Potenciais Riscos	Utilização Química
Antibióticos	Oxitetraciclina (Terramicina), Sulfadimethocin Oxina-ormethiprim	Desenvolvimento de resistência microbiana; Presença de resíduos em alimentos;	Utilizado no tratamento de várias doenças em peixes gato e salmão;
Parasitocidas	<i>Cypermethin</i>	Toxicidade aguda em organismos marinhos;	Controlo de surto marinho de piolhos em salmão;
	<i>Carbaryl</i>	Toxicidade aguda em organismos marinhos;	
	<i>Trichlorfon</i>	Toxicidade aguda em organismos marinhos;	Eliminação de parasitas existentes em lagoas ornamentais de peixes;
	<i>Formalin</i>	Tóxico e irritante;	Controlo de fungos e protozoários em peixes ósseos;
Fertilizantes	Nitrogénio, fósforo e mistura de oligoelementos	Contribuição para o enriquecimento nutricional;	Estimulação da produção de algas em sistemas aquáticos;
Anestésicos	Metanossulfonato	Cancerígeno;	Anestesia de peixes ósseos;
Oxidantes	Permanganato de potássio	Explosivo; Irritante durante manuseamento;	Utilizado em sistemas aquáticos para eliminação de organismos patogénicos e fitoplancton;
	Peróxido de hidrogénio	Irritante durante manuseamento;	
	Hipoclorito de cálcio	Tóxico; Irritante durante o manuseamento	

Tabela 1 - Substâncias farmacologicamente activas de utilização veterinária [6] (cont.).

Tipo de Composto	Exemplos de Compostos	Potenciais Riscos	Utilização Química
Algicidas e Herbicidas	Sulfato de cobre	Em grandes dosagens torna-se tóxico para a vida aquática;	Utilizado para reduzir o crescimento vegetal em sistemas aquáticos.
		Irritante durante o manuseamento;	
	Cobre quelato	Em grandes dosagens torna-se tóxico para a vida aquática;	
	Simazina	Efeitos nocivos no fígado e na tiróide em humanos; Cancerígeno;	
	2,4 - D	Efeitos nocivos nos rins no fígado e no sangue animal; Cancerígeno;	
	Brometo de Diquato	Efeitos nocivos nos rins em humanos;	
	Riciniolate de potássio	Efeitos mínimos.	

1.2.1. PARASITICIDAS

Os *ectoparasitidas* são utilizados para controlo externo de *parasitas* em animais, os *endoparasitidas* para controlar parasitas internos e os endectocidas para tratar tanto parasitas internos como externos. *Ectoparasitidas*, *endoparasitidas* e *endectocidas* são normalmente utilizados para desparasitação de uma vasta variedade de animais. Se não forem controlados, os *ectoparasitas* (ácaros, piolhos, carrapatos, etc.) podem afectar gravemente o bem-estar dos animais.

Encontram-se disponíveis no mercado vários tipos de produtos, estando aprovados para esta utilização uma vasta gama de substâncias activas, **Tabela1**. O consumo destes compostos é actualmente significativo. Estudos recentes estimam um consumo Europeu anual de cerca de 194 toneladas de parasitidas [7].

1.2.2. COCCIDIOSTÁTICOS E ANTIPROTOZOÁRIOS

Os *coccidiostáticos* e os *antiprotozoários* são muitas vezes incorporados nos alimentos para fins medicinais. Isso inclui o uso profilático para a prevenção de doenças como *coccidiose* e *disenteria suína* e o uso terapêutico para o tratamento de outras doenças. Com exceção do *dimetridazol*, a maioria dos compostos encontra-se amplamente indisponível [8]. No entanto, os seguintes compostos são considerados dentro do grupo terapêutico com maior potencial de utilização: *amprólio*, *clopidol*, *lasalocida*, *maduramicina*, *narasina*, *nicarbazina*, *robenidina* e *cloridrato*. Entre os compostos protozoários de maior uso incluem-se o *toltrazuril*, o *decoquinato* e o *diclazuril*.

1.2.3. ANTIFÚNGICOS

Os antifúngicos são usados por via oral no tratamento de micoses, infecções provocadas por fungos e leveduras. As principais substâncias activas utilizadas neste contexto são a *clorohexidina*, o *miconazol* e a *griseofulvina*.

1.2.4. HORMONAS

Apesar de ser actualmente proibida a sua utilização na União Europeia (UE) como factor de crescimento, as hormonas têm outros usos restritos, incluindo, a indução do *estrus* ovulatório, a supressão do *estrus*, a terapia sistémica da progesterona e o tratamento de *hipersexualidades*. Estima-se que na (UE), a quantidade de hormonas utilizadas no tratamento dos animais seja cerca de 4,5 mil toneladas por ano. As principais substâncias activas utilizadas são *altrenogest* e progesterona.

1.2.5. PROMOTORES DE CRESCIMENTO

Os promotores do crescimento são antibióticos adicionados aos alimentos dos animais para melhorar principalmente a eficiência da digestão. Esta prática foi corrente entre 1993 e 1998, mas decaiu em 1999. A proibição da sua utilização na UE foi devida à suspeita de ocorrência de resistência cruzada a antimicrobianos na medicina humana. Contudo a utilização de factores de crescimento prosseguiu em outras regiões do mundo.

Os dados sobre cada um dos compostos antimicrobianos utilizados como factores de crescimento são limitados. Os compostos potencialmente importantes utilizados incluem *monensina*, *flavofosfolipol*, e *salinomina de sódio*.

1.2.6. ANTIBIÓTICOS

De entre os compostos farmacologicamente activos administrados, os antibióticos são os mais utilizados. Estima-se que na UE o consumo destes compostos em produção intensiva de animais ronde as 5000 toneladas/ano. Os antibióticos são drogas de origem sintética ou animal que têm a capacidade de destruir ou inibir o crescimento de microrganismos. Antibióticos suficientemente não tóxicos ao seu hospedeiro são usados como agentes quimioterapêuticos no tratamento de doenças infecciosas nos humanos, animais e plantas. Alguns destes agentes químicos têm estado presentes no ambiente há muito tempo e desempenham um papel importante na luta entre o homem e os *microrganismos*.

Desde a sua descoberta, os antibióticos transformaram completamente a luta da humanidade contra as doenças infecciosas [9]. A utilização dos antibióticos, em conjunto com melhorias na sanidade, nutrição e habitação, em paralelo com o desenvolvimento dos programas de vacinação, levou a uma diminuição dramática das doenças anteriormente prevalentes que dizimaram populações [9]. No entanto, a humanidade depara-se com uma nova crise, decorrente da presença de antibióticos nos tecidos edíveis. A presença de resíduos de compostos antimicrobianos nos tecidos edíveis pode ser o resultado do uso de compostos proibidos ou não autorizados, ou, no caso de compostos permitidos, do não cumprimento dos intervalos de segurança estabelecidos antes do abate dos animais. Estas práticas ilícitas colocam em risco a saúde humana, já que a presença de resíduos de drogas, tanto em alimentos como no meio aquático, é conducente ao aparecimento, nos consumidores, de resistências bacterianas aos antimicrobianos, facto que constitui um gravíssimo problema de saúde pública a nível mundial.

A resistência aos antibióticos é um problema profundo e complexo, para o qual contribuem o uso abusivo dos antibióticos nos países desenvolvidos e o paradoxal sub-uso de antibióticos de qualidade nas nações em desenvolvimento [9]. A emergência de resistência aos antibióticos é considerada por muitos como uma das mais importantes ameaças à saúde humana no século XXI. A resistência microbiana é um fenómeno biológico natural, mas torna-se um problema importante de saúde pública devido à má e negligente utilização dos antibióticos [9]. Em 1887, os cientistas descobriram a capacidade de adaptação dos microrganismos e a sua resistência deveu-se, não apenas a modificações ambientais, mas também a agentes anti-sépticos [10]. Paul Ehrlich foi o primeiro a descrever o desenvolvimento da resistência de um protozoário à terapêutica química no tratamento da malária [10]. A resistência bacteriana emergiu pouco depois da introdução dos antibióticos nos anos 1930 e 1940 [11]. Em meados de 1940, 2 anos apenas após a introdução da penicilina no mercado, os cientistas identificaram uma estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina [9]. Ernst Chain foi o primeiro a descrever a *penicillinase*, uma enzima produzida pelas bactérias para destruir a penicilina [10]. A resistência à vancomicina surgiu

em 1987 nas enfermarias hospitalares e disseminou-se rapidamente nos 4-6 anos seguintes. Mais casos se sucederam, dando origem a um grave problema de saúde pública, com implicações económicas, sociais e políticas, que atravessaram todas as fronteiras [9]. Actualmente, o fenómeno da resistência microbiana pode ser demonstrado em todas as classes de antibióticos disponíveis [11].

O aparecimento de resistências pode ser devido a factores como:

- Mau diagnóstico da doença infecciosa; “paradigma da pobreza” – menor acessibilidade aos fármacos e sub-dosagem;
- Fármacos falsificados (em países em vias de desenvolvimento);
- Utilização de antibióticos de largo espectro em detrimento de antibióticos de espectro mais estreito que tratam doenças específicas;
- Pressões dos doentes (por vezes influenciados pela publicidade);
- Falta de programas educativos e de informação adequada;
- Utilização inadequada dos antibióticos em ambiente hospitalar;
- Presença de antibióticos em alimentos;
- E “globalização” – viagens internacionais e trocas comerciais (um microrganismo resistente pode cruzar o planeta em 24 horas).

Se os antibióticos continuarem a ser utilizados indiscriminadamente, muitos peritos receiam a denominada “era pós-antibiótica” em que os antibióticos se tornam ineficazes no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes [10].

Como principais consequências da resistência microbiana destacam-se [9]:

- Mortalidade – maior incidência de infecções resistentes mais vezes fatais;
- Morbilidade – maior incidência de doenças prolongadas e maior probabilidade de microrganismos resistentes se propagarem a outras pessoas;
- Custos – maiores encargos financeiros com o tratamento, uma vez que se utilizam fármacos novos e mais caros;

Para minorar os riscos associados ao consumo de antibióticos em alimentos de produção animal, a utilização de drogas antimicrobianas é hoje devidamente regulada. Porém, a verificação do cumprimento dos parâmetros legislados para este fim requer métodos analíticos de elevado custo. A nível nacional, os antimicrobianos mais relevantes utilizados em aquacultura com maior relevância são as tetraciclina, as quinolonas, as sulfonamidas, o verde de malaquite, os nitrofuranos e o cloranfenicol. Os três primeiros são de utilização restrita e os três últimos são proibidos no sector

1.2.6.1. SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são um grupo de antibióticos sintéticos que desempenham um papel importante na medicina veterinária, tendo sido amplamente utilizados na alimentação

animal. No entanto, quando o período após o tratamento é demasiado curto para permitir a depuração podem surgir resíduos nos produtos alimentares. Isto representa um risco na saúde humana, devido ao seu potencial cancerígeno e possível papel no desenvolvimento da resistência aos antibióticos [10, 11].

1.2.6.2. CLORANFENICOL

O Cloranfenicol (CAP), Figura 2, é um antimicrobiano que promove a inibição da síntese proteica bacteriana. Este composto possui no entanto, efeitos colaterais prejudiciais sobre os seres humanos, nomeadamente a *anemia aplásica* ou *síndrome-cinzentos*. Devido a estas questões foi proibida a utilização de CAP em animais produtores de alimentos na UE desde 1994. Além disso, a UE definiu um limite máximo de (LMR) para o CAP em alimentos de origem animal igual a $0,3 \text{ g kg}^{-1}$. Mesmo assim, devido ao seu amplo espectro de actividade, à sua elevada disponibilidade e ao seu baixo custo, o uso de CAP continua atractivo em certos países. [14,15].

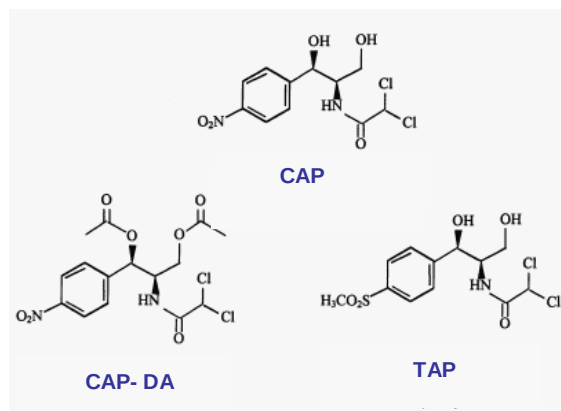


Figura 2 - CAP e seus análogos: CAP diacetato (CAP-DA) e tianfenicol (TAP) [14].

1.2.6.3. TETRACICLINAS

A tetraciclina (TC) e seus análogos, como a doxiciclina (DC), a clortetraciclina (CTC) e a oxitetraciclina (OTC), são antibióticos utilizados comumente em medicina veterinária (Figura 3). No entanto, levantaram-se algumas questões relativamente ao impacto sobre a saúde pública desses antibióticos no ambiente aquático [16-18]. Estas preocupações decorrem da existência de indícios do aumento da resistência bacteriana nas águas residuais provenientes de hospitais e da indústria farmacêutica [19-20].

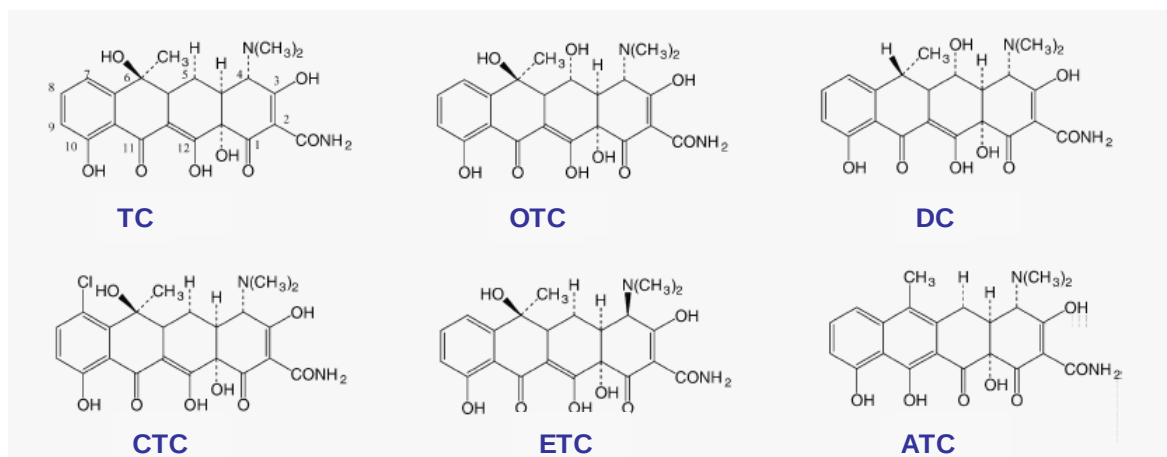


Figura 3- Tetraciclina e seus análogos: TC (tetraciclina), CTC (clortetraciclina), OTC (oxitetraciclina), DC (doxitetraciclina), ETC (epiclortetraciclina)e ATC (anidrotetraciclina).

1.2.6.4. COMPOSTOS NITROSOS

Os nitro-compostos são normalmente utilizados no tratamento de infecções provocadas por bactérias *anaeróbias* e protozoários. Os nitrofuranos têm sido amplamente utilizados, na forma de aditivos, para o tratamento de infecções gastrointestinais causadas por *Escherichia coli* e *Salmonella* em bovinos, suínos e aves, entre outros. [21]. A UE proibiu no entanto, a administração desses compostos em animais produtores de alimentos [22,23] com o objectivo de evitar efeitos prejudiciais na saúde humana, decorrentes dos seus efeitos tóxicos, mutagénicos, cancerígenos e da formação de *metabolitos* com toxicidade potencial em tecidos animais [24]. Mesmo assim, foram encontrados recentemente resíduos de nitrofuranos em aves, crustáceos e moluscos importados pela UE.

Este registo acontece porque estes antibióticos são utilizados ainda em vários países, com níveis de tolerância máxima variando de 1 entre 5 mg kg⁻¹ [25]. Um aspecto analítico importante é que estes antibióticos formam rapidamente proteínas vinculadas (*metabolitos*). Por exemplo, a nitrofurantoína (NFA), (Figura 4), e a nitrofurazona (NFZ) formam 1-aminohidantoina (AHD) e semicarbazida (MEV), respectivamente. Estas proteínas ligadas (*metabolitos*) não são facilmente degradadas e são estáveis ao cozimento e ao microondas.

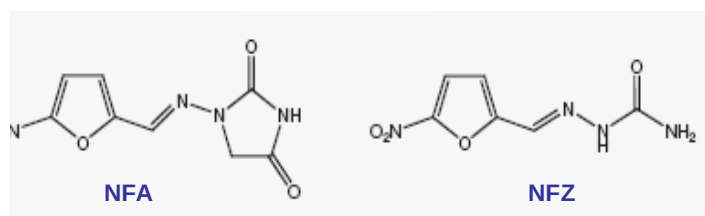


Figura 4- Estrutura química da nitrofurantoina (NFA) e da nitrofurazona (NFZ).

1.2.6.5. FLUORQUINOLONAS

Os fluorquinolonas (FQs) são derivados *piperazinil* das (Figura 5) quinolonas e são utilizadas actualmente na medicina humana e veterinária, como agentes antibacterianos contra várias doenças [26-28]. Elas são consideradas quinolonas de segunda geração com maior eficácia. Ambas apresentam a mesma estrutura, baseada em dois anéis, Figura 5, onde o grupo carboxílico e o cetona são responsáveis pela actividade antibacteriana por inibição da *DNA* girase, enquanto os substituintes nas posições 1 e 7 influenciam a sua eficácia [29].

O uso de FQs em vez de quinolonas tem aumentado nos últimos anos, incluindo-se aqui a Norfloxacin (NOR). Os benefícios da utilização destes antibióticos na medicina são óbvios, mas os abusos observados nos últimos anos levaram à acumulação de resíduos em diferentes compartimentos ambientais, aumentando assim o risco de crescimento e promoção de bactérias resistentes a estes antibióticos [30-32]. Os seus resíduos são potencialmente persistentes [31], podendo ser encontrados em peixe [32,33] pelo que a sua utilização deve ser sujeito a um rigoroso controlo analítico rigoroso, por meio de técnicas apropriadas.

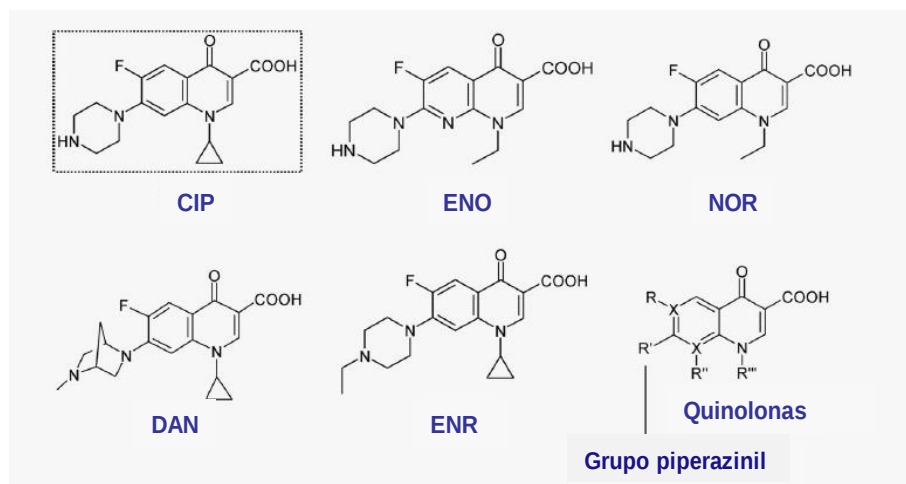


Figura 5- Estrutura molecular de fluorquinolonas e quinolonas: ciprofloxacin (CP), enofloxacin (ENO), NOR, enrofloxacin (ENR). [34].

1.3. MÉTODOS DE ANÁLISE DE ANTIBIÓTICOS EM AQUACULTURA

Muitas técnicas de análise têm sido descritas para a determinação de antibióticos em diferentes matrizes e a diferentes níveis de concentração. É possível referenciar vários métodos que recorrem as técnicas electro-analíticas, ópticas, separativas e microbiológicas.

1.3.1. MÉTODOS SEPARATIVOS

Os métodos instrumentais separativos são os que pressupõem uma separação dos constituintes de interesse na amostra, antes de se efectuar a medida analítica propriamente dita. As técnicas utilizadas neste domínio são a cromatografia e a electroforese.

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

Os detectores de espectrofotometria de massa baseiam-se, de uma forma simples, na razão massa/carga (m/z) dos átomos ou moléculas ionizadas, aluídos através do sistema cromatográfico. Normalmente, esta operação compreende três fases: a criação de uma fase gasosa iónica; a separação dos iões no espaço e no tempo, baseada na razão massa /carga; e finalmente a medição da quantidade de iões em cada uma das razões.

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

A electroforese capilar (EC) é uma técnica que consiste no transporte de partículas carregadas, por aplicação de um campo eléctrico, e que utiliza tubos capilares para obter uma alta eficiência de separação, quer de moléculas grandes, quer de moléculas pequenas. Estas separações são facilitadas por altas voltagens, as quais geram fluxos electro-osmóticos e electroforéticos de soluções tampão e de espécies iónicas, respectivamente, dentro do capilar. A configuração instrumental básica para a EC é relativamente simples. Tudo o que é preciso é um capilar de sílica fundida com uma janela óptica, uma fonte de energia de alta voltagem controlável, desde -25 kV [35-37] a 30 kV [49], dois eléctrodos, dois

reservatórios para tampões e um detector. As extremidades do capilar são colocadas nos reservatórios de tampão e a janela óptica é alinhada com o detector (UV) a 254 nm [36-38].

Para o doseamento de NOR é possível encontrar métodos cromatográficos [38,39], baseados em fenómenos de separação. Estes métodos são simples, rápidos e sensíveis na determinação simultânea de várias FQs. Não se encontram referenciados na literatura métodos electroforéticos para determinação de NOR em águas ambientais.

Genericamente, os métodos baseados em técnicas separativas fornecem resultados analíticos de boa precisão e exactidão. Numa perspectiva da sua aplicação ao controlo de rotina, é importante referir a necessidade de estabelecer alguns procedimentos, que podem ser complexos, antes de se proceder à introdução das soluções a ensaiar no sistema separativo. São exemplos a desgasificação, a filtração e os longos períodos de condicionamento da coluna de separação. O equipamento envolvido é, também, dispendioso e requer, de uma forma geral, pessoal especializado para o seu funcionamento. Neste sentido, a implementação destas metodologias em controlo analítico de rotina poderá não ser a mais adequada, pela impossibilidade de realização de análises expeditas. Em alternativa, encontram-se também os métodos electroanalíticos na literatura.

1.3.2. MÉTODOS ELECTROANALÍTICOS

Nos métodos electroanalíticos, a informação sobre a solução em estudo é obtida pela medida de uma propriedade de natureza eléctrica. Estes métodos apresentam algumas vantagens relativamente a outros métodos instrumentais. As medidas são, na sua maioria, selectivas para um determinado elemento e o equipamento requerido é pouco dispendioso. Para além disso, estes métodos permitem obter informação quantitativa para quantidades de analíto, muitas vezes, vestígias. Podem, também, fornecer informação sobre estequiometria e constantes de equilíbrio, processos de transferência de massa, velocidade e reversibilidade de reacções, etc. São diversas as estratégias instrumentais no campo electroanalítico, dando origem a múltiplas técnicas, como a potenciometria, a voltametria, a polarografia, etc. Apesar desta diversidade não se encontram métodos analíticos desta natureza para a determinação de NOR em alimentos ou amostras ambientais.

1.3.3. MÉTODOS ÓPTICOS

Todos os métodos ópticos envolvem uma interacção da matéria com a radiação electromagnética. Parte da radiação electromagnética pode ser absorvida e parte da radiação pode se dispersa ou reemitida, com ou sem variação do comprimento de onda. Também podem ocorrer variações nas propriedades da radiação absorvida, tal como uma

mudança de direcção num estado de polarização. Os fenómenos ópticos existentes incluem a absorção, emissão, difracção, dispersão, reflexão e polarização, em toda a gama do espectro electromagnético, desde o raio X até ao microondas.

A base generalizada da análise espectrofotométrica de absorção é a medida da fracção de radiação que é absorvida ao longo de uma gama alargada de espectro electromagnético. Muitos sistemas químicos podem ser excitados pela radiação electromagnética e reemitir ao mesmo tempo a outro comprimento de onda. Estes sistemas denominam-se por fotoluminescentes, dentro dos quais se poderão distinguir os fluorescentes e os fosforescentes. Estes dois tipos de fotoluminescência são produzidos por mecanismos diferentes, cessando na fluorescência a emissão logo após a interrupção da incidência da radiação, ao contrário da fosforescência em que aquela perdura durante um curto intervalo de tempo, depois de a radiação incidente ter sido interrompida. A radiação emitida pode situar-se na zona do visível, ultravioleta, ou noutras gamas mais energéticas do espectro, como a do raio X [40-42].

A intensidade de radiação fluorescente permite determinar quantitativamente vestígios de muitas espécies orgânicas e inorgânicas, tendo o método limites de detecção muito baixos, geralmente na ordem dos ppb (parte por bilião). Contudo, esta técnica não é tão aplicada como os métodos de absorção porque só um número mínimo de sistemas emite radiações fluorescentes. A fosforescência é ainda menos utilizada sob o ponto de vista analítico, por motivos semelhantes. As principais vantagens são a simplicidade, rapidez e a adequabilidade para a detecção de quinolonas em concentrações abaixo dos (LMR), estabelecidos. Para fenómenos de absorção não se encontram referenciados métodos na literatura.

1.3.3.1. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Os métodos espectroscópios têm como base a absorção e/ou emissão de radiação electromagnética (Figura 6) por muitas moléculas, quando os seus electrões se movimentam entre níveis energéticos. A espectrofotometria consiste na absorção da radiação nos comprimentos de onda entre o ultravioleta e o infravermelho [51].

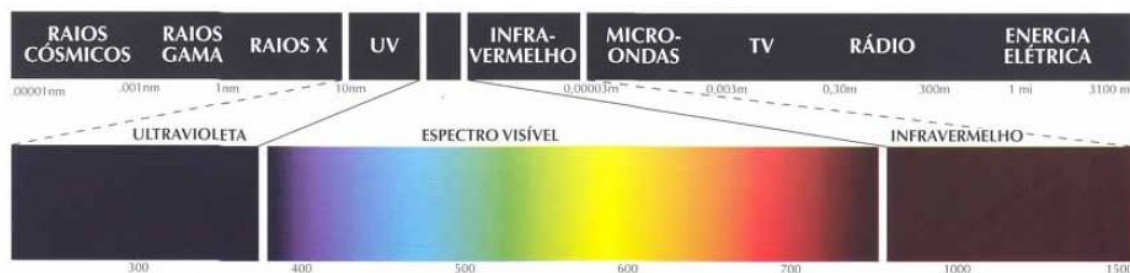


Figura 6 – Uma secção do espectro de energia electromagnética que mostra a escala de comprimento de onda correspondendo ao espectro visível [62].

A espectrofotometria visível e ultravioleta é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio activo de fármacos [50].

A espectroscopia de absorção molecular é valiosa para a identificação dos grupos funcionais na molécula. Mais importante, entretanto, são as aplicações da espectroscopia de absorção visível / ultravioleta para a determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorventes [50].

Um espectrofotómetro é um aparelho que faz passar um feixe de luz monocromática através de uma solução e mede a quantidade de luz que foi absorvida por essa solução. O aparelho separa a luz em feixes com diferentes comprimentos de onda (tal como acontece no arco-íris com a separação das cores da luz branca) através de um prisma. Pode-se assim fazer passar através da amostra um feixe de luz monocromática (de um único comprimento de onda, ou quase). O espectrofotómetro permite-nos saber que quantidade de luz é absorvida a cada comprimento de onda. A absorção da luz é tanto maior quanto mais concentrada for a solução por ela atravessada. [51].

Relativamente às cuvets, para espectrofotómetro mais simples (económicos) usam cuvets com a forma cilíndrica, os mais sofisticados usam cuvets rectangulares, geralmente com uma largura de 1 cm. Para espectroscopia apenas no visível, simples cuvets de vidro podem ser usadas, porém a espectroscopia no ultravioleta requer cuvets especiais feitas de um material que (ao contrário do vidro) não absorva luz UV, como o quartzo.

Não se encontraram referências bibliográficas, referente à determinação espectrofotométrica da NOR em águas ambientais.

1.4. SISTEMAS SENSORES

Um sensor químico pode ser definido como um dispositivo que proporciona informação contínua sobre o seu ambiente. Idealmente, um sensor químico fornece um certo tipo de resposta, directamente relacionado com a quantidade de espécies químicas específicas. Todos os sensores químicos consistem num codificador, que transforma a resposta num sinal, registado num determinado equipamento, e apresentam uma camada quimicamente selectiva que isola a resposta do analito do ambiente imediato. Os sensores podem ser classificados de acordo com a natureza da propriedade a ser determinada como eléctricos, ópticos, de massa e térmicos.

1.4.1. SENSORES ÓPTICOS

A fase sensora de um sensor óptico, ou *optode*, constitui o seu elemento primordial. Este é formado por um reagente imobilizado, que possui características adequadas para uma dada aplicação [52]. O reagente deve estar acessível para interagir com o analito, de forma a favorecer uma resposta rápida, sem sofrer lixiviação. Este aspecto é fundamental no desenvolvimento de sensores ópticos, encontrando-se referenciadas na literatura diferentes estratégias de imobilização baseadas em membranas poliméricas [53], sol-gel [54], polímeros de impressão molecular [55], entre outros.

As vantagens dos sensores ópticos [56-58] estão relacionadas com suas propriedades inerentes, como o facto de não necessitarem de um sinal de referência, não sofrerem interferências eléctricas ou electromagnéticas; serem seguros para uma monitorização *in locus*; permitirem a transmissão de sinais ópticos a grandes distâncias; facultarem a detecção em ambientes perigosos, tóxicos, radioactivos ou em locais de difícil acesso. Além disso, estas unidades de detecção são facilmente miniaturizáveis, o que constitui uma vantagem em termos de concepção de dispositivos portáteis para análise *in vivo* e também quando se dispõe de volume reduzido de amostra. Adicionalmente, podem responder a mais de um analito simultaneamente, usando vários reagentes imobilizados, com resposta em diferentes comprimentos de onda [59].

Relativamente às desvantagens dos sensores ópticos, estes sofrem interferência da radiação ambiente, o que obriga muitas vezes à modelação do sinal; os reagentes utilizados podem ser susceptíveis a fotodecomposição e lixiviação, prejudicando o tempo de vida do sensor [60], o número de reacções reversíveis é limitado, necessitando de regenerar o sinal de referência a cada medida; e apresentam geralmente um intervalo de resposta limitado. Apesar dessas limitações, os sensores ópticos configuram-se como uma alternativa promissora aos procedimentos convencionais e têm sido largamente aplicados em diferentes áreas [61].

1.4.1.1. CONCEITO DE COR E SUA MEDIÇÃO

Na nossa sociedade actual, profundamente baseada em cores, a qualificação e a quantificação da cor são fundamentais. São exemplos desta necessidade a produção de peças de vestuário, de tintas, de corantes, etc. A reprodução de uma dada cor não é fácil, iniciando-se esta árdua tarefa pela caracterização da imagem corada. Naturalmente, o primeiro problema prende-se com a própria imagem, sujeita a uma variabilidade extrema, de acordo com o observador ou com o equipamento de aquisição...

1.4.1.2. SISTEMA VISUAL HUMANO

A cor é formada no sistema visual humano a partir de impulsos eléctricos gerados por sensores sensíveis à luz, existentes nos olhos. Estes sensores podem emitir diferentes impulsos eléctricos ao cérebro variando de acordo com o comprimento de onda de cada cor primária. O cérebro recebe e processa esses sinais resultando na sensação da visão das cores [62].

As cores que o sistema visual humano consegue observar são provenientes de combinações de cores primárias. Na realidade, o cérebro divide as cores de acordo com as regiões indicadas na **Figura 7**.

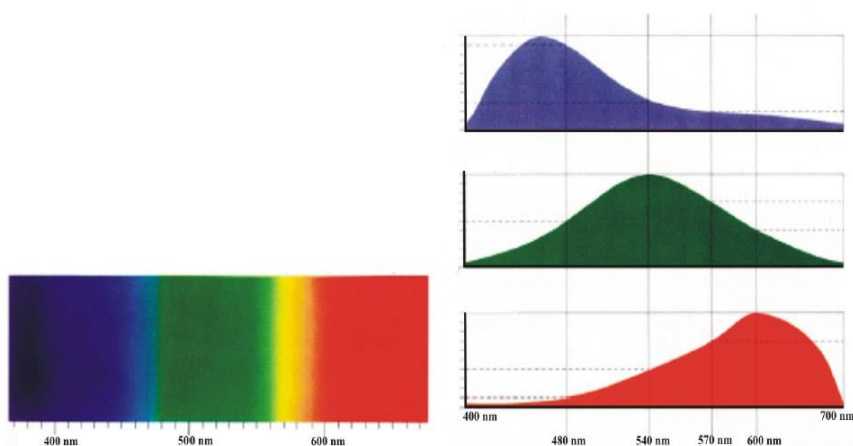


Figura 7 – Espectro visível [62].

O cristalino absorve aproximadamente 8% da luz incidente. As luzes infravermelha e ultravioleta são ambas intensamente absorvidas por proteínas na estrutura do cristalino, prevenindo o dano das estruturas oculares [63]. A luz passa da córnea até ao cristalino através de uma abertura chamada pupila. Esta abertura encolhe ou dilata de acordo com a intensidade da luz através da acção da íris, conforme a **Figura 8** [62].

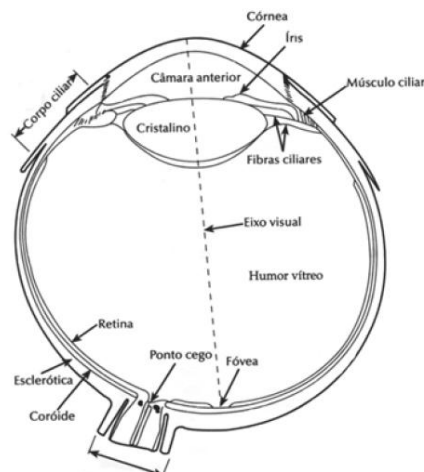


Figura 8 – Diagrama simplificado de uma secção do olho humano [64].

Sobre toda a porção posterior do olho encontra-se uma membrana denominada retina, que recebe a imagem de um objecto observado, incorporando a radiação reflectida por esse mesmo objecto. A retina possui, para este efeito, receptores de luz sobre a sua superfície. Os fotoreceptores e as terminações nervosas sensíveis à luz estão localizados sobre a superfície da retina. Estas células são denominadas cone e bastonete. O número de cones em cada olho varia entre 6 a 7 milhões. Eles são posicionados principalmente na região central da retina, chamada fóvea, sendo altamente sensíveis a cores. Os músculos que controlam o olho fazem rotação do globo ocular até que a imagem do objecto de interesse caia sobre a fóvea. Os bastonetes são encontrados numa porção maior em relação aos cones e são distribuídos sobre a superfície da retina. Os bastonetes são muito úteis para detectar movimento e para visualização com baixo nível de luminosidade e ao contrário dos cones, que não estão envolvidos com a visão colorida [62].

1.4.1.3. CORES PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS

Todas as cores que o ser humano consegue visualizar podem ser geradas por combinações variáveis das 3 cores primárias: vermelho, (R, do inglês *red*), verde (G, do inglês *green*) e de azul (B, do inglês *blue*). A Comissão Internacional sobre Iluminação (CIE, *Commission Internationale del'Eclairage*) padronizou que os comprimentos de onda máximos das cores primárias são: azul de 435,8 nm; verde de 546,1 nm e vermelho 700 nm.

As cores secundárias da luz podem ser produzidas a partir da adição das cores primárias, sendo estas: magenta (vermelho e azul), ciano (verde e azul) e amarelo (vermelho e verde). Tal como se pode observar na **Figura 9**, a mistura das 3 cores primárias, ou de uma secundária com a sua cor primária oposta, em intensidade correcta produz a luz branca. Pelo contrário, a mistura das cores secundárias com o seu primário oposto produz o preto.

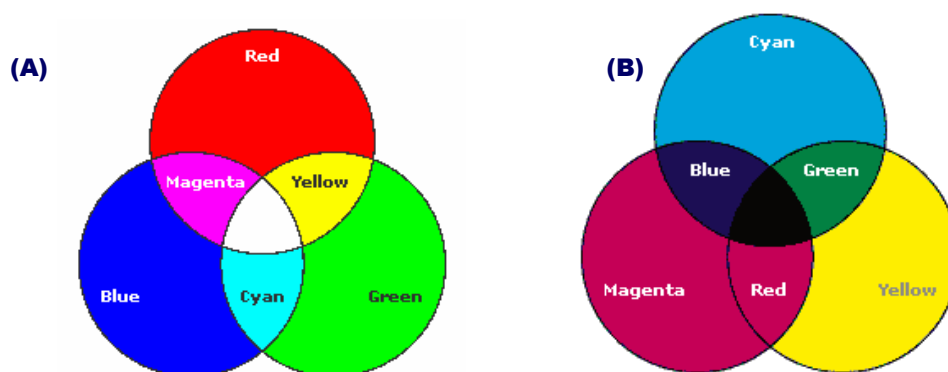


Figura 9 – Cores primárias (A) e secundárias (B) [63].

1.4.1.4. ESPAÇO DE COR

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. Conforme se pode verificar na **Figura 10A**, os espaços de cor gerados são diferentes. Os mais conhecidos são RGB, o CMYK, o HSB, o HSL e o CIE-Lab. Alguns modelos conseguem representar mais cores do que outros [65].

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 detectado por variações na sua intensidade. 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.

1.4.1.5. MODELOS DE CORES

Os modelos de cor fornecem métodos que permitem especificar uma determinada 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. O modelo utilizado para descrever as cores emitidas ou projectadas é considerado aditivo e para as cores impressas é considerado subtrativo.

Num modelo aditivo a ausência de luz ou de cor corresponde à cor preta, enquanto a mistura dos comprimentos de onda ou das cores vermelha (*Red*), verde (*Green*) e azul (*Blue*) indicam a presença da luz ou a cor branca (**Figura 9A**). O modelo aditivo explica a mistura dos comprimentos de onda de qualquer luz emitida.

Num modelo subtrativo, ao contrário do modelo aditivo, a mistura de cores cria uma cor mais escura, porque são absorvidos mais comprimentos de onda, subtraindo-os à luz. A ausência de cor corresponde ao branco e significa que nenhum comprimento de onda é

absorvido, mas sim todos reflectidos (**Figura 9B**). O modelo subtrativo explica a mistura de pinturas e tintas para criarem cores que absorvem alguns comprimentos de onda da luz e reflectem outros. Assim, a cor de um objecto corresponde à luz reflectida por ele e que os olhos recebem.

Os modelos de cores RGB e CMYK são essenciais à computação gráfica e à impressão, porém cada dispositivo gera a sua cor conforme as suas características físicas e químicas. Na necessidade de criar modelos de cores com espaço de cor independente do dispositivo, o comité da CIE criou o modelo de cores HSB – (*hue, saturation and brightness* ou matiz, saturação e brilho) e HSL (*hue, saturation, and lightness* ou matiz, saturação e luminosidade). 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 11** para definir a cor [67]. A diferença entre ambos é que o brilho de qualquer tonalidade pura é igual ao brilho do branco puro (HSB), enquanto a luminosidade de qualquer cor pura equivale à luminosidade de um cinzento médio (HSL).

➤ **MODELO RGB**

O espaço RGB é um modelo é um modelo aditivo, que descreve as cores como uma combinação das três cores primárias: vermelho, verde e azul (**Figura 10B**) [65]. A mistura aditiva dá-se quando se obtém uma cor proveniente da soma das luzes coloridas emitidas por duas ou mais fontes. As aplicações deste modelo estão associados à emissão de luz por equipamentos como monitores de computador e ecrãs de televisão

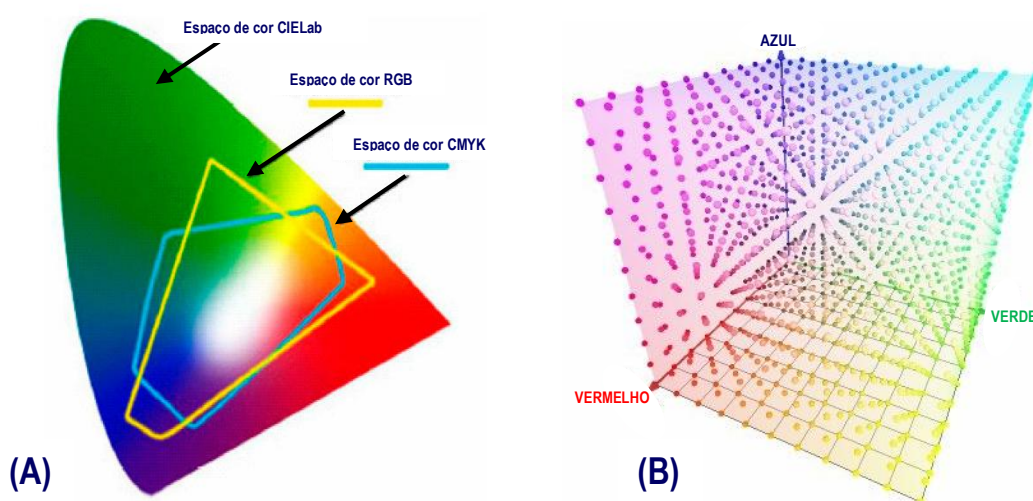


Figura 10 – Representação do Espaço de Cor [66].

➤ **MODELO CMY(K)**

O Modelo CMY é um modelo subtrativo, porque as cores são criadas para redução de outras à luz que incide na superfície de um objecto. Ele descreve as cores como uma combinação das três cores primárias designadas por C (*cyan* – ciano), M (*magenta*), Y (*yellow* – amarelo). O modelo CMYK é constituído a partir deste acrescentado a cor K (preto). A cor preta foi adicionada ao modelo por ser mais fácil a sua obtenção quando impressa em papel do que recorrendo à mistura de cores.

O modelo CMYK é utilizado na impressão em papel e usa as cores do modelo CMY e a tinta preta (K) para realçar melhor os tons de preto e cinza. Este modelo utiliza-se em impressoras, fotocopiadoras, pintura e fotografia.

➤ **MODELO HSB**

O espaço HSB (Figura 11) baseia-se na percepção humana das cores e não nos valores do espaço de cor dependente do dispositivo. O olho humano vê cores como componentes de matiz, saturação e brilho. O matiz baseia-se no comprimento de onda de luz reflectida de um objecto, ou transmitida por ele. A saturação, também chamada de croma, é a quantidade de cinza numa cor. Quanto mais alta a saturação, mais baixo é o conteúdo e mais intensa é a cor. O brilho é uma medida de intensidade de luz numa cor [68].

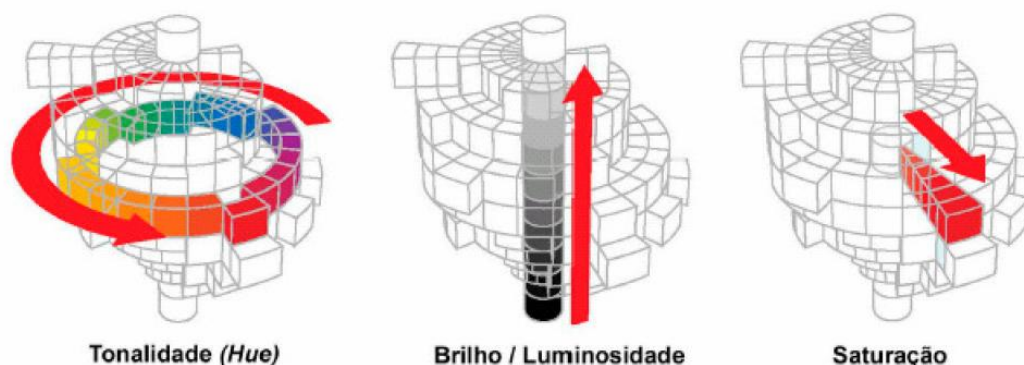


Figura 11 – Tonalidade, Luminosidade e Saturação [67].

➤ **MODELO XYZ**

O sistema XYZ de cores primárias da CIE descreve as cores através de três cores primárias virtuais X, Y e Z (Figura 12). Esse sistema foi criado devido à inexistência de um conjunto finito de cores primárias que produza todas as cores visíveis. Nesse sistema, as cores C_i podem ser expressas pela seguinte equação:

$$C_l = x.X + y.Y + z.Z \quad (1)$$

Em que X, Y e Z especificam as quantidades das cores primárias padrão necessárias para descrever uma cor espectral. A normalização dessa quantidade em relação à luminância (X+Y+Z) possibilita a caracterização de qualquer cor. As cores desse sistema podem ser expressas como combinações das quantidades normalizadas abaixo:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \quad y = \frac{Y}{X+Y+Z} \quad z = \frac{Z}{X+Y+Z} \quad (2)$$

com $x + y + z = 1$. Assim, qualquer cor pode ser definida apenas pelas quantidades de x e y que, por dependerem apenas da matiz e da saturação, são chamadas de coordenadas de cromaticidade. A descrição completa de uma cor é dada pelas coordenadas de cromaticidade e pelo valor de um dos 3 estímulos originais, normalmente do Y, é o que contém a informação de luminância. Essa descrição possibilita a obtenção das quantidades de X e Z com a equação 3, onde $z = 1 - x - y$.

$$X = \frac{x}{y}Y \quad Z = \frac{z}{y}Y \quad (3)$$

O sistema XYZ é formado por cores imaginárias que são definidas matematicamente [69].

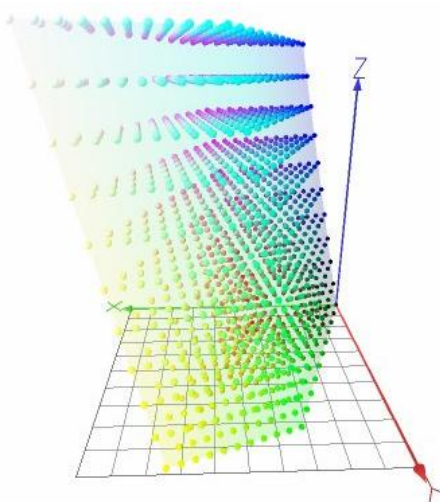


Figura 12– Espaço de cor YXZ.

➤ **MODELO CIELAB**

O modelo de cor CIELab permite a especificação de percepções de cores em termos de um espaço tridimensional, variando todas as componentes entre 0 e 100. A componente axial L é conhecida como luminosidade e estende-se de preto (0) a branco (+100). As outras duas coordenadas a* e b* estendem-se de -100 a +100, variando do verde ao vermelho e do azul ao amarelo, respectivamente. O espaço de cores CIE 1976 (L*a*b*) proporciona uma representação tridimensional para a percepção do estímulo de cores (Figura 13). Conforme

aumenta a distância entre os dois pontos no espaço é razoável assumir que a diferença de cor percebida entre os estímulos representa aumentos correspondentes [67]. Uma medida da diferença na cor entre dois estímulos é, portanto, proporcional à distância Euclidiana entre dois pontos no espaço tridimensional [70].

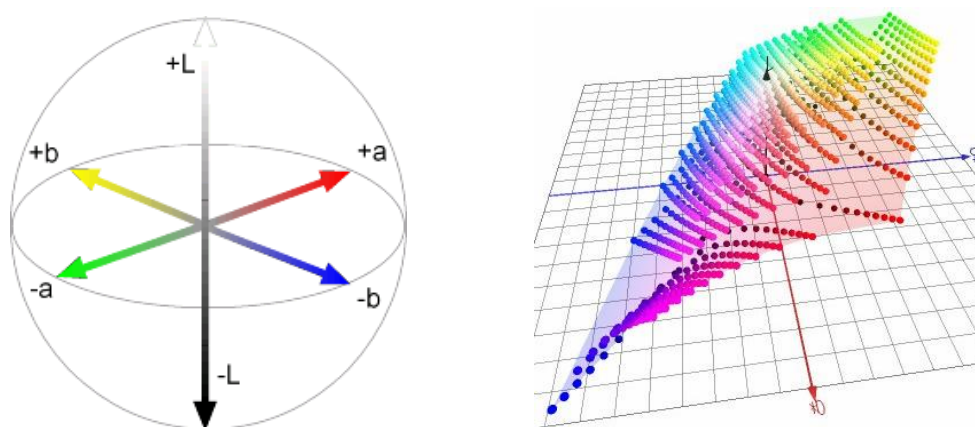


Figura 13 – Espaços de cor CIE Lab [68].

O modelo CIE Lab é percebido mais linearmente que outros espaços de cores, onde linear significa que a troca da mesma quantia num valor de cor pode produzir sobre a mesma importância visual.

Considerando os pressupostos anteriores, a avaliação da cor é complexa e pode ser efectuada com base em vários modelos. O controlo de cor é parte integral em diversas profissões e, dependendo da aplicação desejada, é possível escolher um espaço de cor apropriado. Uma forma simples de monitorizar a cor nos sensores ópticos pressupõe a utilização do sistema rápido, barato e simples, disponível em todos os laboratórios de análise, tais como os espaços RGB (ou o similar HSL) associados aos programas do Windows. Para este efeito torna-se necessário fotografar os resultados obtidos e adquirir as coordenadas da cor num qualquer software de manipulação de imagem.

2. DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Genericamente, o trabalho desenvolvido teve início na optimização dos parâmetros operacionais necessários para o desenvolvimento posterior de um sensor óptico selectivo a NOR. Ao longo deste capítulo são referidas as metodologias envolvidas na optimização, na avaliação e na aplicação dos sensores desenvolvidos.

2.2 MATERIAL E APARELHOS UTILIZADOS

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com capacidades de 50,00 a 1000,00 mL. Para as medições de volumes rigorosos iguais ou superiores a 5,00 mL foram usadas pipetas volumétricas de vidro, classe A. Para volumes inferiores recorreu-se a pipetas automáticas Gilson[®], modelos P100, P1000 e P5000, de volume regulável. As pesagens foram realizadas nas balanças seguintes: Kern 770, com precisão igual a 0,00001g e Kern EW 220-3NM de precisão 0,0001g.

Sempre que era necessário promover a dissolução de substâncias sólidas, numa tentativa de reduzir o tempo envolvido nesse processo, foi usado um banho de ultra-sons termostatzado, da marca Fungilab, S.A, *ultrasonic cleaner*.

A leitura das absorvâncias foi efectuada no espectrofotómetro Evolution 300 BB UV-Visible.

A medição do pH para a preparação das soluções tampão foi realizada no pH Meter GLP 22, Crison®. Para a preparação das membranas de PVC usaram-se agitadores magnéticos correntes de laboratório e uma placa de aquecimento com agitação, Agimatic-N. As membranas sensoras foram depositadas em placas policarbonato com 8 poços de capacidade de 200 µL)

2.3 REAGENTES

A água utilizada para a preparação das soluções aquosas foi ultra-pura, com uma condutividade igual ou inferior a $0,054 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 25°C. Os reagentes utilizados foram todos de qualidade p.a., sem terem sido sujeitos a qualquer purificação adicional.

As soluções aquosas mais concentradas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes e posterior dissolução e diluição num solvente apropriado. A NOR, o bis(2-etilhexil)sebacato (BES), 2-nitrofenil octil éter (ONFOE), di-n-octilftalato (DOF), dibutilftalato (DBF), bis(etilhexil)ftalato (BEF) e o fenilglicileter (FGE), o PVC de alto peso molecular e o cloreto de manganês foram produzidos pela Fluka; o tetrahydrofurano (THF) pela Panreac, o cloreto de Fe (III) hexahidratado, o aluminon e o cloreto de cobre bi-hidratado foram produzidos pela Merck; e o nitrato de alumínio hidratado, o nitrato de chumbo (II), o molibdato de amônio tetrahidratado, o nitrato de níquel hexahidratado, o nitrato de cobalto hexahidratado, o cloreto de estanho (IV), o Vanadium (V), a tetraciclina, a sulfadiazina, a clorpromazina, a enrofloxacin, o trimetoprim e a oxitetraciclina foram produzidos pela Sigma.

2.4 SELECÇÃO DA ESPÉCIE METÁLICA E EFEITO DO MEIO

A reacção colorimétrica foi estabelecida entre o antibiótico NOR e diferentes espécies metálicas, entre os quais: Fe (III), Al (III), Pb(II), Aluminon, Mo(II), Mn(II), Ni(II), Cu(II), Co(II), Sn(II) e V (V). Para este efeito, misturaram-se 2 mL de NOR 1×10^{-3} M com 1 mL de solução da espécie metálica, com uma concentração igual a 1×10^{-2} M. As cores obtidas foram registadas e comparadas.

O efeito do meio de formação do complexo foi estudado em termos de composição e de pH. Para isso, a solução padrão de NOR $1,00 \times 10^{-3}$ M foi preparada em H_2SO_4 0,05 M ou tampão HEPES 1×10^{-2} M. As soluções do metal, de concentrações iguais a 1×10^{-2} M, foram igualmente preparadas em H_2SO_4 0,05 M e em tampão HEPES 1×10^{-2} M. De seguida, adicionou-se 1 mL de solução da espécie metálica preparada em H_2SO_4 , a 2 mL de solução de NOR preparada em H_2SO_4 , fazendo-se o mesmo para a NOR e os catiões preparados em tampão HEPES. A escolha do catião que ofereceu melhores condições de complexação

com a NOR foi feita com base na intensidade e definição da cor formada. O catião escolhido para este estudo foi o Fe(III).

2.5 MONITORIZAÇÃO DA COR

2.5.1 EM MEIO LÍQUIDO

Numa fase inicial foram traçados espectros de absorção de todos os componentes do sistema de reacção, preparados na mesma concentração (1×10^{-3} M) e usando o meio de preparação das mesmas como branco. Foram preparadas para este efeito soluções de Fe(III), soluções de NOR e soluções de Fe(III) + NOR. O valor máximo de absorvância registado nos espectros de absorção do complexo antibiótico/metal foi obtido a 440 nm, tendo-se seleccionado este valor de comprimento de onda para leitura de absorvância de cada uma das soluções ensaiadas.

Considerando que a solução de Fe(III) apresentava uma coloração amarela, em resultado da existência das espécies $\text{Fe}(\text{OH})_2^{2+}$ e $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, esta absorvia também ao mesmo comprimento de onda. Para minimizar este efeito, optou-se por avaliar a absorvância de uma solução equivalente mas que não contivesse NOR. Os dois valores de absorvância obtidos com as soluções de complexo e de Fe(III) foram subtraídos, descontando-se assim o efeito do próprio reagente no resultado final.

2.5.2 EM SUPERFÍCIE SÓLIDA

Os resultados obtidos foram fotografados e manipulados pelo programa PAINT do Windows utilizando-se as coordenadas Tonalidade, Saturação e Luminosidade (espaço HSL). Os valores destas coordenadas foram sujeitos a tratamento matemático e representados graficamente em função da concentração de NOR. Os resultados obtidos apresentados corresponderam sempre à média de, pelo menos, três leituras em cada sensor.

2.6 ESTUDO DO EFEITO DO PH

O efeito do pH foi avaliado em solução tampão acetato 1×10^{-3} M, cujo pH foi ajustado para valores compreendidos entre 2,4 e 6,1 unidades de pH por combinação adequada de soluções de ácido acético/acetato $1,0 \times 10^{-3}$ M. Este efeito foi estudado através do traçado de curvas de calibração para cada condição de pH ensaiada (2,4; 3,3; 4,1; 5,0 e 6,1). Cada calibração envolveu 10 soluções padrão de Fe(III), com concentrações compreendidas entre $1,1 \times 10^{-5}$ e $2,1 \times 10^{-4}$ M. Estas soluções apresentavam uma concentração em NOR igual a $1,03 \times 10^{-4}$ M.

2.7 ESTUDO DA PROPORÇÃO MOLAR DO COMPLEXO

Para o valor de pH 3,0 foi avaliada a proporção molar do complexo Fe (III)/NOR. A concentração de NOR foi fixada a um valor de $1,02 \times 10^{-4}$ M, fazendo-se variar a concentração de Fe(III) entre cerca de $2,5 \times 10^{-5}$ M a $2,5 \times 10^{-4}$ M. As leituras de absorvância correspondentes a cada concentração obtida foram realizadas a um comprimento de onda de 440 nm. A representação gráfica da absorvância em função da concentração de Fe(III) indicou dois segmentos lineares, cujo ponto de intercepção corresponde à concentração de Fe(III) necessária para consumir todo o antibiótico presente.

2.8 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO COMPLEXO

Para avaliar a estabilidade do complexo corado foi monitorizada a absorvância de várias soluções ao longo de 24 h, contendo uma concentração de NOR $1,03 \times 10^{-4}$ M, preparada em tampão acetato 1×10^{-3} M, pH 3, e uma gama de concentrações de Fe(III) a variar entre $3,33 \times 10^{-5}$ M e $6,33 \times 10^{-4}$ M. Os valores de absorvância obtidos foram representados graficamente.

2.9 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO

O estudo do efeito da concentração de ferro na intensidade da coloração obtida foi realizado com base em curvas de calibração. Estas curvas foram baseadas em soluções tampão preparadas a pH 3,0 e para concentrações de NOR compreendidas entre 2×10^{-5} M a 7×10^{-4} M em NOR. Os valores de concentração de Fe(III) escolhidos para cada curva de calibração foram iguais a $1,2 \times 10^{-2}$ M, $1,3 \times 10^{-3}$ M e de $3,8 \times 10^{-4}$ M. Os valores de absorvância de cada solução foram obtidos a 440 nm.

O traçado gráfico de cada curva de calibração foi realizado utilizando o programa de computador, Microsoft Excel 2007. Os parâmetros das curvas de calibração avaliados foram o declive o coeficiente de correlação e valor inferior de resposta linear. Esses parâmetros foram calculados com base no traçado de, pelo menos, 2 curvas de calibração consecutivas ou intercaladas.

2.10 EFEITO DE ESPÉCIES INTERFERENTES

Para a análise de interferentes foi efectuada uma mistura reaccional, a pH 3,0, com $3,50 \times 10^{-5}$ M NOR, $1,08 \times 10^{-3}$ M de Fe(III) e concentrações variáveis de possíveis espécies interferentes. Os catiões escolhidos para este estudo foram o Ba(II), Pb(II), Hg(II), Mn(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II) e Fe(II). A leitura das absorvâncias foi realizada a um comprimento de onda de 440 nm.

2.11 PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DO SENSOR

O sensor teve como base a incorporação do Ferro (III) numa membrana de PVC plastificada com solvente mediador. Efectuou-se o estudo do efeito do solvente mediador e da quantidade de Fe(III) na cor do complexo formado na superfície da membrana. Os solventes utilizados foram (o-nitrofenil)octil éter, di-n-octilftalato, dibutilftalato, *bis*(etilhexil)sebacato, *bis*(etilhexil)ftalato.

2.12 OPTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SENSOR

2.12.1 SELECÇÃO DA QUANTIDADE DE FERRO

As membranas sensoras foram preparadas com 0,050 g de PVC, 0,10 g de solvente mediador e 0,50 g; 1,00 g, 1,50 g ou 0,25 g de Fe (III). A mistura foi agitada até o PVC se encontrar dissolvido em cerca de 2 mL de THF. O sensor óptico foi obtido por deposição de 50 µL de solução de membrana sensora na cavidade da placa de policarbonato e secagem posterior, na *hotte*, para evaporação do THF.

A reacção de complexação foi efectuada por deposição de 150 µL de uma solução de NOR, com um pH 3,0 e com concentrações variáveis de NOR, na membrana sensora depositada na placa. A gama de concentrações de NOR utilizada estava compreendida entre 1.0×10^{-3} M e 1.0×10^{-5} M de NOR.

2.12.2 SELECÇÃO DO SOLVENTE MEDIADOR

Prepararam-se várias membranas de PVC. A quantidade de Fe(III) utilizada foi de 0,5 g, variando-se apenas o tipo de solvente mediador entre *bis*(etilhexil)sebacato, 2-nitrofenil)octil éter, di-n-octilftalato, dibutilftalato, *bis*(etilhexil)ftalato e fenilglicileter.

2.12.3 SELECÇÃO DA QUANTIDADE DE SOLVENTE MEDIADOR

Utilizando apenas o solvente mediador seleccionado no ponto anterior, prepararam-se várias membranas de PVC, de modo igual ao indicado nos pontos descritos anteriormente, com base em quantidades variáveis de solvente mediador. As quantidades de solvente mediador estudadas foram de 0,02 g, 0,030 g, 0,05 g; 0,10 g e de 0,15 g.

2.13 CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DO SENSOR SÓLIDO

Utilizando a membrana sensora otimizada (0,508 g de Fe (III), 0,053 g de PVC, 0,105 g de BES e 2 mL de THF), traçaram-se várias curvas de calibração. A leitura de cada concentração foi efectuada por deposição, numa membrana sensora, de 150 µL de solução

padrão de NOR, de concentrações iguais a $5,00 \times 10^{-5}$ M, $5,00 \times 10^{-4}$ M, $1,00 \times 10^{-3}$ M, $2,00 \times 10^{-3}$ M, $4,00 \times 10^{-3}$ M ou $2,00 \times 10^{-2}$ M. Uma das membranas foi usada para a realização de um ensaio em branco (zero), tendo-se colocado apenas o meio de preparação da solução padrão.

O traçado da curva de calibração foi realizado em Microsoft Excel, 2007, após tratamento matemático das coordenadas de cor obtidas pelo sistema HSL. Os parâmetros das curvas de calibração avaliados foram o declive, o coeficiente de correlação e o intervalo de concentração correspondente a uma resposta linear. Esses parâmetros foram calculados com base no traçado de, pelo menos, 2 curvas de calibração consecutivas ou intercaladas.

2.14 EFEITO DE OUTROS ANTIBIÓTICOS

O efeito de outros antibióticos na reposta da membrana sensora foi avaliado com base na adição de aliquotas de 150 μ L de diferentes antibióticos (incluindo a NOR) na membrana de PVC seleccionada. Os antibióticos foram a tetraciclina, a sulfadiazina, a clorpromazina, a enrofloxacin, o trimetoprim e a oxitetraciclina de concentrações de 1×10^{-3} M. Estes antibióticos podem estar presentes em amostras do sector da aquacultura.

2.15 DESENVOLVIMENTO DE UM ARRAY

No sentido de obter uma resposta mais exacta, o modo de preparação das membranas sensoras foi aplicado a outras espécies metálicas, para além do Fe(III), tais como o aluminon, Cu^(II) e Mn (II). Estas espécies foram aquelas que, depois do Fe(III) ofereceram uma resposta mais intensa à presença de NOR. Esta conjugação de metais numa mesma placa permitiu desenvolver um *array* de sensores para a despistagem de NOR em águas de aquacultura.

Para este efeito, foram preparadas 4 membranas de PVC usando Fe(III), ao aluminon, ao Cu(II) e ao Mn(II) com uma quantidade igual à incorporada na membrana previamente optimizada. Para cada catião foi efectuado o ensaio em branco que corresponde à composição da membrana sem sensor (catião).

Para traçar a curva de calibração de cada uma das membranas, foram testadas 6 soluções padrão de NOR, de concentrações 1×10^{-2} M, 4×10^{-3} M, 2×10^{-3} M, 1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M e de 5×10^{-5} M, e um branco, identificando-se para cada metal um gradiente de cores diferente.

Os resultados obtidos foram manipulados após fotografia digital, pelo programa de cores PAINT utilizando-se as coordenadas da Tonalidade, Saturação e Luminosidade.

Os resultados das análises apresentados corresponderam sempre à média de, pelo menos, três leituras em cada sensor. A precisão dos resultados foi calculada por intermédio do desvio padrão correspondente.

2.16 APLICAÇÃO À ANÁLISE DE ÁGUAS

O *array* de sensores, preparados de acordo com o procedimento indicado no ponto 2.9.1, foi aplicado à análise de amostras ambientais. A calibração correspondente foi simplificada, testando-se três soluções padrão e um branco em simultâneo com as amostras.

Foram adicionadas aliquotas de 150 μL de amostra de água ambiental, de solução padrão ou de tampão em cada membrana sensora. A concentração real da amostra foi determinada através dos parâmetros da curva de calibração (declive e ordenada na origem) traçada para cada metal ensaiado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento de um sensor óptico para despistagem de NOR em águas de aquacultura. Este sensor óptico deve conter uma espécie metálica capaz de formar um complexo corado com a NOR. Os estudos efectuados iniciam-se, por isso, pela identificação da espécie metálica mais adequada, subsequente caracterização do complexo formado entre essa espécie e a NOR e da selecção das condições mais adequadas à sua formação, no sentido de permitir a sua aplicação em análise quantitativa com base em curvas de calibração. Este conceito é aplicado de modo similar a outras espécies metálicas, no sentido de obter uma resposta analítica mais exacta para a determinação de NOR através de um *array* de sensores.

3.1. SELECÇÃO DA ESPÉCIE METÁLICA

A NOR pode formar complexos corados com algumas espécies metálicas. O tipo e intensidade de cor formada dependem, entre outros, da natureza da espécie metálica utilizada e do pH/constituição do meio. Neste estudo, optou-se para averiguar os resultados obtidos com vários metais, nomeadamente Fe(III), Al(III), Pb(II), Aluminon, Mo(II), Mn(II), Ni(II), Cu(II), Co(II), Sn(II) e V(V), no sentido de seleccionar aquele que se revelou capaz de formar um complexo de coloração mais intensa.

Os resultados obtidos encontram-se representados na tabela 2. A primeira coluna desta tabela corresponde à presença (bola verde) ou possível ausência (cruz vermelha) de formação de complexo. Nas colunas seguintes encontram-se a coloração e a fotografia da solução do catião isolado, bem como o estado de oxidação do metal utilizado, a composição química do sólido correspondente e o meio de preparação desta solução. A coloração da solução final, composta pela mistura de 1 mL de solução de metal 1×10^{-2} M com 2 mL da solução de NOR 1×10^{-3} M, e a fotografia correspondente podem ser encontradas nas últimas colunas. Os resultados obtidos indicaram vários metais capazes de formar complexos corados com a NOR, mencionados de seguida.

A espécie **Fe(III)** em solução passou de incolor a dourado, quando preparada em H_2SO_4 0,05 M, ou a amarelado, quando preparada em HEPES. Note-se que neste último meio verificou-se a formação de algum precipitado. Este precipitado poderá resultar do insolubilização de NOR ou dar indicação de que o complexo entre o Fe(III) e a NOR poderia apresentar uma solubilidade reduzida em meio aquoso.

O catião **Mo(II)** conduziu à formação de um complexo quando as soluções se encontravam preparadas em H_2SO_4 0,05 M. A coloração observada foi bastante ténue e, mais uma vez, ocorreu a insolubilização de alguma espécie ou a formação de uma espécie de reduzida solubilidade. A reduzida intensidade de coloração não apontou, porém, para que esta espécie fosse a mais adequada para a preparação de sensores ópticos selectivos a NOR.

O **aluminon** é o sal de triamónio do ácido aurin-tricarboxílico, um corante vulgarmente utilizado para detectar alumínio em solução aquosa, formando também pigmentos corados com alguns metais como o crómio, o ferro e o berílio. Em solução HEPES, o aluminon apresentou uma cor vermelha límpida, passando a rosa/vermelho escuro quando adicionado de NOR.

A solução de **Mn(II)** apresentou-se incolor em solução de H_2SO_4 0,05 M e passa a verde-água quando adicionada de NOR. Esta coloração foi acompanhada de algum precipitado, sugerindo, novamente, a insolubilização de alguma espécie ou a formação de um novo composto de reduzida solubilidade. Em solução HEPES não se verificou qualquer alteração por adição de NOR.

A espécie **Ni(II)** em tampão HEPES apresentou uma coloração ténue, de tom esverdeado. Após adição de NOR, a solução apresentou um tom esverdeado mais intenso, tendo esta alteração sido acompanhada da formação de algum precipitado.

A solução de **Cu(II)** em tampão HEPES apresentou-se com uma coloração azul-água. Esta coloração deu lugar a um tom esverdeado após a adição da solução de antibiótico. Ambas as soluções se apresentaram límpidas, não se verificando qualquer turvação.

Tabela 2 - Resultados das misturas de cátions com o antibiótico NOR.

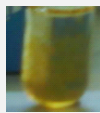
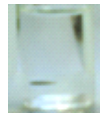
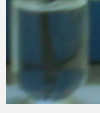
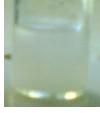
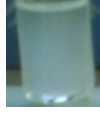
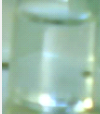
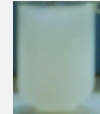
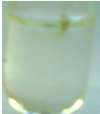
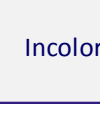
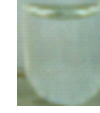
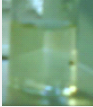
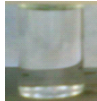
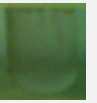
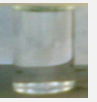
Cor do Cátion isolado	Cátion isolado	Cátion	Solvente	Antibiótico	Especificação da cor	Complexo formado
	Incolor	 Fe^{3+} $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	H_2SO_4 0,05M	NOR	Dourado	
	Incolor	 Fe^{3+} $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	HEPES	NOR	Amarelo + precipitado.	
	Incolor	 Al^{3+} $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	H_2SO_4 0,05M	NOR	Incolor	
	Incolor	 Al^{3+} $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	HEPES	NOR	Incolor	
	Sol. Baça	 Pb^{2+} $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	H_2SO_4 0,05M	NOR	Igual ao cátion isolado	
	Incolor	 Pb^{2+} $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	HEPES	NOR	Branco turvo	
	Vermelho baço	 Aluminon	H_2SO_4 0,05M	NOR	Vermelho baço	
	Vermelho límpido	 Aluminon	HEPES	NOR	Rosa velho	
	Incolor	 Mo^{2+} $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	H_2SO_4 0,05M	NOR	Verde água + Precipitado	
	-	 Mo^{2+} $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	HEPES	NOR	Sol. Baça	-
	Incolor	 Mn^{2+} $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	H_2SO_4 0,05M	NOR	Incolor	
	Incolor	 Mn^{2+} $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	HEPES	NOR	Castanho muito ténue	-

Tabela nº 2 - Resultados das misturas de cátions com o antibiótico NOR (cont.).

Cor do cátion isolado	Cátion isolado	Cátion	Solvente	Antibiótico	Especificação da cor	Complexo formado
X Esverdeado tênue	-	Ni ²⁺ N ₂ NiO ₆ ·6H ₂ O	H ₂ SO ₄ 0,05M	NOR	Cor igual à do cátion isolado	-
● Esverdeado tênue	-	Ni ²⁺ N ₂ NiO ₆ ·6H ₂ O	HEPES	NOR	Esverdeado + Precipitado	-
X Incolor		Cu ²⁺ CuCl ₂ ·2H ₂ O	H ₂ SO ₄ 0,05M	NOR	Incolor	
● Azul água tênue		Cu ²⁺ CuCl ₂ ·2H ₂ O	HEPES	NOR	Esverdeado	
X Rosa tênue		Co ²⁺ Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	H ₂ SO ₄ 0,05M	NOR	Cor igual à do cátion isolado	
● Precipitado Rosa tênue		Co ²⁺ Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	HEPES	NOR	Violeta clarinho	
X Incolor		Sn ²⁺ Cloreto de Estanho IV	H ₂ SO ₄ 0,05M	NOR	Incolor	
X Incolor		Sn ²⁺ Cloreto de Estanho IV	HEPES	NOR	Incolor	
X Verde clarinho	-	Vanadium	H ₂ SO ₄ 0,05M	NOR	Incolor	-
X Verde clarinho	-	Vanadium	HEPES	NOR	Incolor	-

Por último, a solução de ião **Co(II)** em tampão HEPES apresentou um precipitado ligeiro, de coloração rosa tênue. A adição de NOR conduziu à formação de um complexo de coloração violeta, promovendo a dissolução do precipitado inicial.

Perante os resultados obtidos, optou-se pela escolha do catião Fe(III) para a preparação do sensor. Este metal originou a solução de coloração mais intensa, não se tendo verificado a existência de qualquer precipitado. Outros metais também susceptíveis de serem aplicados a sistemas de despistagem por observação de cor foram o Aluminon, o Mn(II) e o Cu(II). Para estes a intensidade de coloração foi inferior, característica que poderia condicionar a sensibilidade do método aquando da sua utilização em fase sólida.

3.2. EFEITO DE PH

De um modo geral, o pH afecta grandemente a intensidade de coloração de um determinado complexo em solução, em virtude de condicionar a estabilidade e a extensão de formação desse complexo e o tipo e concentração de espécies de Fe. Neste sentido, e tendo como base apenas o catião metálico Fe(III), foram efectuados estudos que visaram identificar o pH mais adequado à formação do complexo metal/NOR. Os valores de pH das soluções ensaiadas estavam compreendidos entre 2 e 6, preparadas em tampão acetato.

Para uma concentração em NOR constante, e capaz de garantir a complexação de todo o Fe(III) presente, o valor de absorvância foi maior para maiores concentrações do catião metálico. Este comportamento correspondeu ao previsto, já que o aumento da quantidade de iões Fe(III) disponíveis conduziu à formação de uma maior quantidade de complexo, o que, por sua vez, resultou numa maior absorvância da solução obtida. Todos os valores médios de absorvâncias experimentais e as concentrações de Fe(III) correspondentes podem ser consultados na Tabela 3.

Tal como se pode verificar na Figura 14, o comportamento do sistema colorimétrico foi muito diferente para vários valores de pH estudados. Os valores paramétricos destes registos gráficos foram indicados na tTabela 4. De uma forma geral, o declive aumentou com o aumento de pH até um máximo de $812,2 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH 3, tendo decrescido, de uma forma geral, para valores superiores a este. Relativamente à estabilidade e extensão do complexo formado para os diferentes valores de pH nada se conhece, mas existem múltiplas espécies de ferro em solução de acordo com o pH, facto que da poderá justificar, por si, os registos obtidos.

Tabela 3 - Valores de absorvância obtidos a pH 2, 3, 4, 5 e 6, para a solução de complexo Fe(III) / NOR e para a solução de Fe(III) e sua diferença.

pH	[Fe(III)]		Abs		
	M	$\mu\text{mol/L}$	Complexo	Fe (III)	Diferença
2,41	$1,11 \times 10^{-5}$	11,11	0,0180	0,0010	0,0170
	$3,33 \times 10^{-5}$	33,33	0,0430	-0,0040	0,0470
	$5,56 \times 10^{-5}$	55,56	0,0680	0,0040	0,0640
	$7,78 \times 10^{-5}$	77,78	0,0640	0,0010	0,0630
	$1,00 \times 10^{-4}$	100,00	0,0660	0,0140	0,0520
	$1,22 \times 10^{-4}$	122,22	0,0900	0,0340	0,0560
	$1,44 \times 10^{-4}$	144,44	0,1050	0,0190	0,0860
	$1,67 \times 10^{-4}$	166,67	0,1050	0,0200	0,0850
	$1,89 \times 10^{-4}$	188,89	0,1290	0,0280	0,1010
	$2,11 \times 10^{-4}$	211,11	0,1340	0,0410	0,0930
3,31	$1,11 \times 10^{-5}$	11,10	0,0730	0,0130	0,0600
	$3,33 \times 10^{-5}$	33,30	0,0970	0,0290	0,0680
	$5,56 \times 10^{-5}$	55,60	0,1350	0,0390	0,0960
	$7,78 \times 10^{-5}$	77,80	0,1490	0,0400	0,1090
	$1,00 \times 10^{-4}$	100,00	0,1830	0,0550	0,1280
	$1,22 \times 10^{-4}$	122,00	0,2160	0,0740	0,1420
	$1,44 \times 10^{-4}$	144,00	0,2590	0,0910	0,1680
	$1,67 \times 10^{-4}$	167,00	0,2760	0,1020	0,1740
	$1,89 \times 10^{-4}$	189,00	0,2980	0,1260	0,1720
	$2,11 \times 10^{-4}$	211,00	0,2950		
4,12	$1,11 \times 10^{-5}$	11,10	0,0180	-0,0260	0,0440
	$3,33 \times 10^{-5}$	33,30	0,0590	-0,0080	0,0670
	$5,56 \times 10^{-5}$	55,60	0,0650	0,0400	0,0250
	$7,78 \times 10^{-5}$	77,80	0,1110	0,0300	0,0810
	$1,00 \times 10^{-4}$	100,00	0,1290	0,0780	0,0510
	$1,22 \times 10^{-4}$	122,00	0,1950	0,0840	0,1110
	$1,44 \times 10^{-4}$	144,00	0,1960	0,0730	0,1230
	$1,67 \times 10^{-4}$	167,00	0,2880	0,1120	0,1760
	$1,89 \times 10^{-4}$	189,00	0,2330	0,1370	0,0960
	$2,11 \times 10^{-4}$	211,00	0,2580	0,1500	0,1080
4,97	$1,11 \times 10^{-5}$	11,10	-0,0120	-0,0340	0,0220
	$3,33 \times 10^{-5}$	33,30	-0,0010	-0,0140	0,0130
	$5,56 \times 10^{-5}$	55,60	0,0060	-0,0210	0,0270
	$7,78 \times 10^{-5}$	77,80	0,0300	0,0000	0,0300
	$1,00 \times 10^{-4}$	100,00	0,0920	-0,0100	0,1020
	$1,22 \times 10^{-4}$	122,00	0,1220	0,1020	0,0200
	$1,44 \times 10^{-4}$	144,00	0,1490	0,1200	0,0290
	$1,67 \times 10^{-4}$	167,00	0,1690	0,1490	0,0200
	$1,89 \times 10^{-4}$	189,00	0,1930	0,1480	0,0450
	$2,11 \times 10^{-4}$	211,00	0,1970	0,1440	0,0530
6,08	$1,11 \times 10^{-5}$	11,10	-0,0040	-0,0140	0,0100
	$3,33 \times 10^{-5}$	33,30	0,0220	0,0000	0,0220
	$5,56 \times 10^{-5}$	55,60	0,0360	0,0340	0,0020
	$7,78 \times 10^{-5}$	77,80	0,1090	0,0540	0,0550
	$1,00 \times 10^{-4}$	100,00	0,1300	0,0810	0,0490
	$1,22 \times 10^{-4}$	122,00	0,1530	0,1070	0,0460
	$1,44 \times 10^{-4}$	144,00	0,1810	0,1310	0,0500
	$1,67 \times 10^{-4}$	167,00	0,1820	0,1660	0,0160
	$1,89 \times 10^{-4}$	189,00	0,2190	0,1580	0,0610
	$2,11 \times 10^{-4}$	211,00	0,2220	0,1560	0,0660

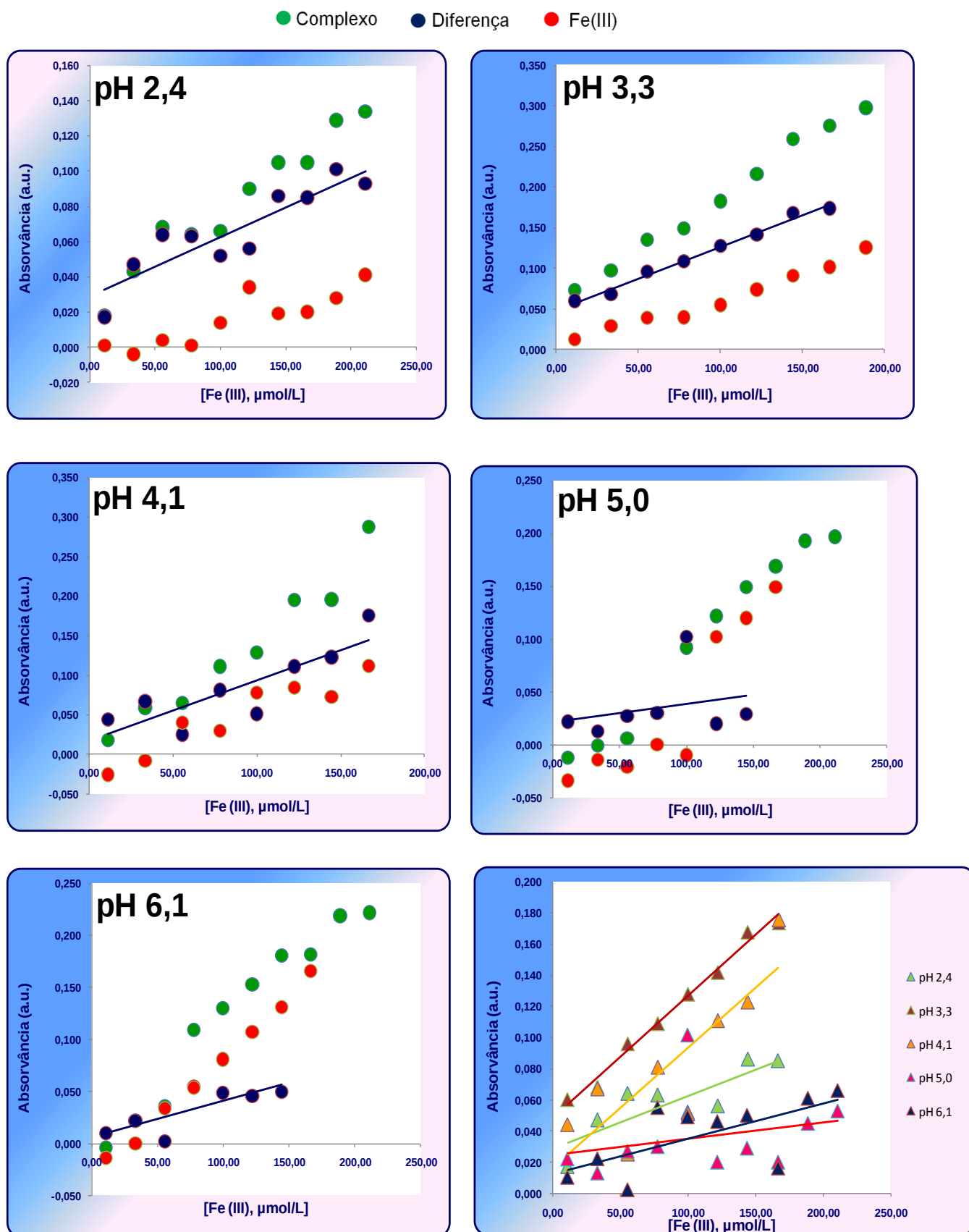


Figura 14 - Variação do valor da absorvância da solução de complexo e de Fe(III) e a sua diferença em função da concentração de Fe(III), para soluções a diferentes valores de pH.

O valor de pH determina qual a espécie de ferro disponível e predominante em solução. De uma forma geral, prevalece a insolubilização do ferro pela formação de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ para valores de pH superiores a 2,5. A um valor de pH 6 a insolubilização do ferro é quase total, permanecendo em solução uma fracção muito reduzida, e em igual quantidade, de espécies $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ e $\text{Fe}(\text{III})$. Para um valor de pH 5 as espécies de ferro solúveis no meio são as mesmas mas apresentam-se numa concentração mais elevada. Para pH 4 o panorama é semelhante, voltando-se a registar um aumento de concentração das espécies solúveis de ferro. A este valor de pH é possível encontrar, também a espécie $\text{Fe}(\text{OH})_2^{2+}$, embora numa concentração ainda muito reduzida. Reduzindo o pH para 3 é possível encontrar em solução as mesmas três espécies de ferro referidas anteriormente, iniciando-se nesta fase o aparecimento de uma nova espécie $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ [71].

Tabela 4 – Parâmetros analíticos relativos à variação da diferença de absorvância entre o complexo corado e o $\text{Fe}(\text{III})$, obtida a vários valores de pH.

pH	Declive, $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	O.O.	R^2	Gama de Linearidade, M
2,4	342,32	0,0284	0,6175	$1,11 \times 10^{-5}$ - $1,44 \times 10^{-4}$
3,3	812,21	0,0470	0,9889	$1,11 \times 10^{-5}$ - $1,67 \times 10^{-4}$
4,1	767,80	0,0165	0,7115	$1,11 \times 10^{-5}$ - $1,67 \times 10^{-4}$
5,0	178,22	0,0209	0,0795	$1,11 \times 10^{-5}$ - $1,44 \times 10^{-4}$
6,1	346,70	0,0065	0,5887	$1,11 \times 10^{-5}$ - $1,44 \times 10^{-4}$

O comportamento registado apresentou uma tendência linear evidente apenas a pH 3. Neste sentido, este valor parece indicar a necessidade de uma situação de compromisso entre a existência de uma espécie de ferro solúvel e a estabilidade do complexo formado com a NOR. A ausência de um comportamento linear na grande parte dos ensaios restantes resultou, provavelmente, da subtracção da absorvância residual do reagente $\text{Fe}(\text{III})$. Na realidade, o valor subtraído foi sempre superior (mas de extensão desconhecida) ao valor de $\text{Fe}(\text{III})$ remanescente em solução, já que este mesmo se encontrava maioritariamente complexado com a NOR, deixando de constituir uma interferência na medida de absorvância do seu próprio complexo.

De uma forma geral, os melhores resultados foram obtidos a pH 3. Esta condição originou a maior sensibilidade e o intervalo de linearidade mais alargado, para uma melhor qualidade de resposta linear. A gama de linearidade correspondente encontrava-se entre $1,1 \times 10^{-5}$ e $1,7 \times 10^{-4}$ M. Este valor de pH foi, por isso, seleccionado para os restantes ensaios.

3.3. PROPORÇÃO MOLAR DO COMPLEXO

O estudo da relação molar entre os elementos constituintes do complexo foi estabelecido apenas para o valor de pH escolhido anteriormente. A proporção molar Fe(III) / NOR foi obtida com base na medição das absorvâncias resultantes de soluções que continham uma concentração fixa em NOR e variável em Fe(III), para ± 10 vezes a concentração de antibiótico. Os resultados obtidos foram indicados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de absorvância obtidos para a solução de complexo Fe(III) / NOR e para a solução de Fe(III) e sua diferença.

Padrão	[Fe(III)]	Abs		
	M	Complexo	Fe (III)	Diferença
1	$2,41 \times 10^{-5}$	0,0540	-0,0090	0,0630
2	$4,82 \times 10^{-5}$	0,1240	-0,0013	0,1253
3	$7,23 \times 10^{-5}$	0,1580	-0,0015	0,1595
4	$9,64 \times 10^{-5}$	0,2320	0,0050	0,2270
5	$1,21 \times 10^{-4}$	0,2390	0,0220	0,2170
6	$1,45 \times 10^{-4}$	0,2880	0,0530	0,2350
7	$1,69 \times 10^{-4}$	0,2970	0,0650	0,2320
8	$1,93 \times 10^{-4}$	0,3110	0,0960	0,2150
9	$2,17 \times 10^{-4}$	0,3470	0,1020	0,2450
10	$2,41 \times 10^{-4}$	0,3660	0,1240	0,2420

De acordo com a representação gráfica obtida, foi possível constatar que o aumento da concentração de Fe(III) originou um aumento da absorvância da solução ensaiada até que toda a NOR se esgotasse em solução. A partir deste momento a adição contínua de Fe(III) não produziu qualquer variação significativa no valor de absorvância lido, já que não existia em solução antibiótico disponível para complexar com o metal. Neste sentido, a proporção molar obtida de NOR:Fe(III) foi considerada igual a 1:1. O ponto de intercepção da Figura 15 mostra precisamente que a adição de $1,0 \times 10^{-4}$ M de Fe(III) consumiu toda a NOR presente na solução, cuja concentração era igual a $1,0 \times 10^{-4}$ M.

A partir dos dados representados graficamente foi estabelecido um tratamento matemático que permitisse obter o valor da constante de formação do complexo [72], sugerindo assim alguma informação acerca da sua estabilidade. Para este efeito, foi estabelecida a representação gráfica de $[\log(Aa-Ax)/(Ax-Ao)]$ em função de $\log [Fe(III), M]$ (Figura 16), cujos valores foram indicados na tabela 6. A tendência linear observada indicou os valores da constante de formação, já que a intercepção com o eixo dos xx' correspondeu ao valor de $\log K_f$. O valor da constante de formação assim obtida foi igual a aproximadamente

14420, um valor considerado elevado e apontando para a elevada estabilidade e extensão do complexo formado.

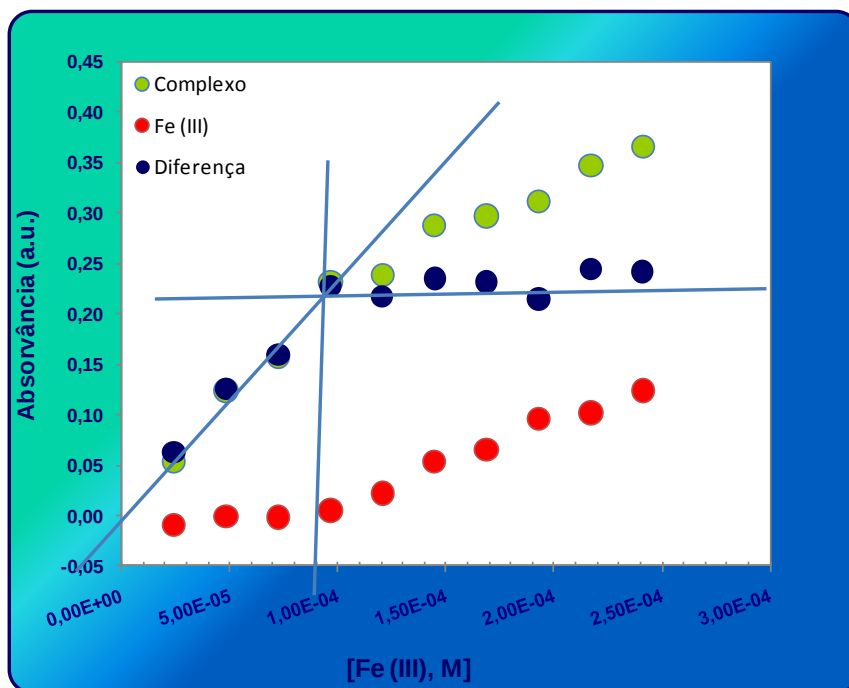


Figura 15 - Proporção molar de NOR:Fe(III), 1:1.

Tabela 6 – Valores obtidos pelo tratamento matemático imposto aos resultados obtidos no estudo de proporção molar do complexo.

$\log [\text{Fe(III)}, \text{M}]$	$\log[(A_a - A_x)/A_x - A_0]$
-4,48	0,44
-4,26	0,20
-4,11	0,09
-4,00	-0,12
-3,91	-0,34
-3,84	-0,74
-3,78	-0,95

Aa: Absorvância máxima;
 Ax: Absorvância da amostra;
 A0: absorvância inicial

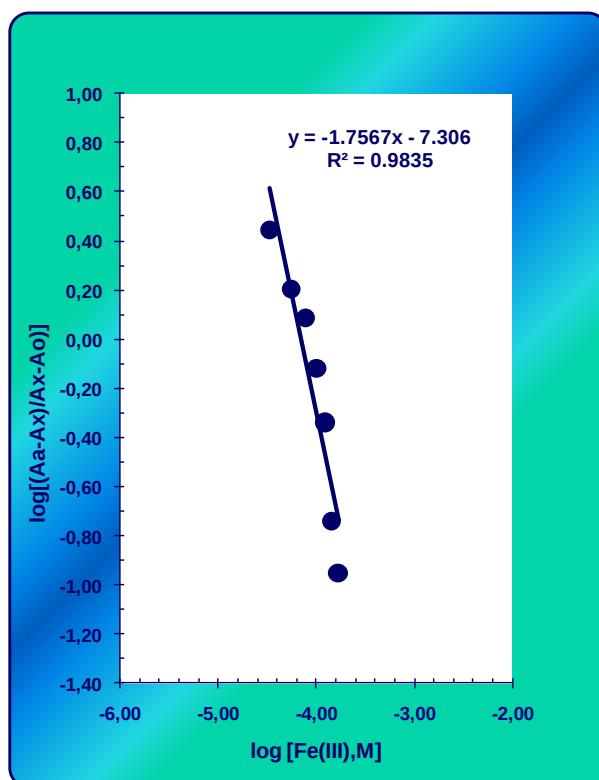


Figura 16 – Regressão linear entre $[\log(Aa-Ax)/(Ax-Ao)]$ e $\log [Fe(III), M]$.

3.1.1. ESTUDO DA ESTABILIDADE DO COMPLEXO

A elevada estabilidade de um complexo ao longo do tempo determina que a sua absorvância se mantenha praticamente invariável. O oposto a este padrão de comportamento é a variação contínua do valor de absorvância ao longo do tempo, num percurso antagónico entre a formação lenta do complexo e o seu curto tempo de vida. Neste sentido, o importante é estabelecer um período de tempo de leitura passível de conduzir a um resultado analítico fiável, apesar de ser sempre condição favorável a existência de um complexo de longo tempo de vida.

A estabilidade do complexo Nor/Fe(III) foi avaliada pela monitorização da absorvância de soluções padrão ao longo de um dia. Os valores de absorvância relativos a 0, 58, 97, 1376 e 1409 minutos (correspondentes a t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , e t_4) foram indicados na Tabela 7 e representados em função da concentração de Fe(III) na Figura 17.

Os resultados obtidos indicam, de um modo geral, que o complexo permanece estável durante as primeiras horas, reduzindo a sua concentração de modo evidente ao fim de um período de quase 24 h de existência. Neste sentido, todas as soluções preparadas devem ser devidamente analisadas num período de cerca de 90 minutos, não podendo permanecer em espera para leitura no dia seguinte. O mesmo conceito será válido para os sensores de natureza sólida preparados mais adiante.

Tabela 7 - Valores das absorvâncias obtidas para a diferença entre a absorvância do complexo e a absorvância de Fe(III) ao longo do tempo.

Padrão	[Fe(III)]		Absorvância (Diferença)				
	M	$\mu\text{mol L}^{-1}$	19.11.2009		20.11.2010		
			t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
1	$3,33 \times 10^{-5}$	11,11	0,0600	0,0660	0,0660	0,0720	0,0730
2	$1,00 \times 10^{-4}$	33,33	0,0680	0,0690	0,0680	0,0660	0,0640
3	$1,67 \times 10^{-4}$	55,56	0,0960	0,0950	0,0940	0,0790	0,0810
4	$2,33 \times 10^{-4}$	77,78	0,1090	0,1080	0,1050	0,0790	0,0660
5	$3,00 \times 10^{-4}$	100,00	0,1280	0,1250	0,1230	0,0690	0,0670
6	$3,67 \times 10^{-4}$	122,22	0,1420	0,1360	0,1320	0,0640	0,0620
7	$4,33 \times 10^{-4}$	144,44	0,1680	0,1610	0,1540	0,0790	0,0770
8	$5,00 \times 10^{-4}$	166,67	0,1740	0,1640	0,1550	0,0580	0,0580
9	$5,67 \times 10^{-4}$	188,89	0,1720	0,1570	0,1470	0,0690	0,0690
10	$6,33 \times 10^{-4}$	211,11		0,1040	0,0860	0,0110	0,0110

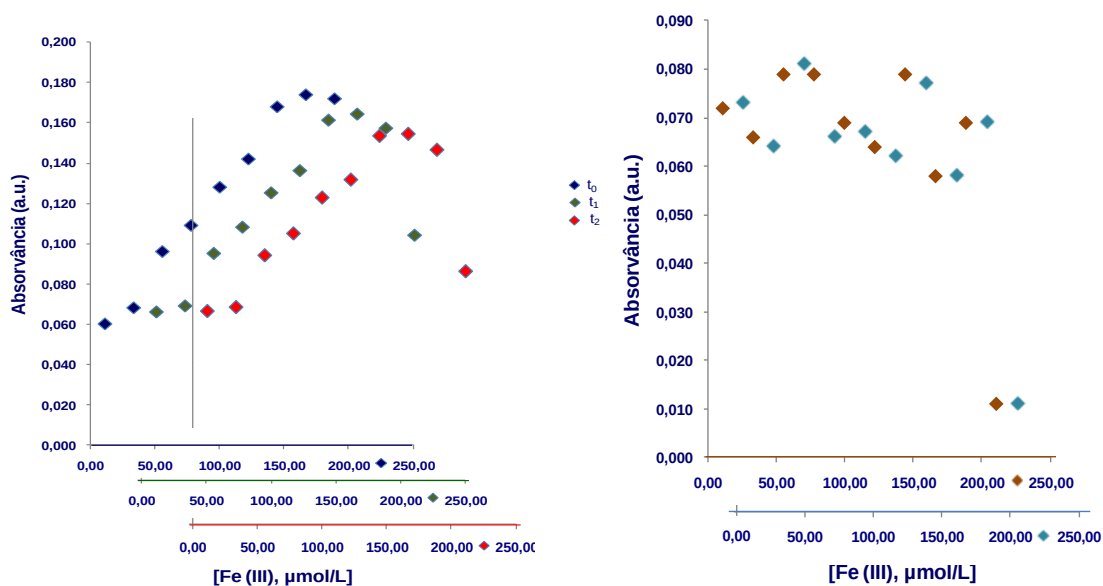


Figura 17 - Diferença entre a absorvância do complexo e a absorvância de Fe(III) para os tempos t_0 , t_1 e t_2 , referentes ao dia 19.11.2010 (esquerda) e para os tempos t_3 , t_4 , referentes ao dia 20.11.2010

3.2. ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO DE Fe (III)

Considerando que o analito em estudo foi a NOR, considerou-se importante identificar qual a concentração em Fe(III) que garantia a rápida complexação de toda a NOR em solução sem um consumo excessivo de reagente. Neste sentido, procedeu-se ao traçado de curvas de calibração ao longo de uma gama de concentrações de NOR compreendida entre $1,77 \times 10^{-5}$ M e $7,08 \times 10^{-4}$ M, tendo-se registado a diferença de absorvância entre a solução de complexo e a solução de Fe(III). Estes ensaios foram efectuados com uma concentração constante de Fe(III) em solução, de valor compreendido entre $1,20 \times 10^{-2}$ M e $3,84 \times 10^{-4}$ M. Os resultados obtidos foram indicados na tabela 8 e a sua representação gráfica pode ser encontrada na Figura 18.

Tabela 8 Valores de absorvância obtidos para a diferença entre as absorvâncias das soluções de complexo e de metal, com uma concentração em Fe(III) igual a $1,20 \times 10^{-2}$ M (A), $1,33 \times 10^{-3}$ M (B) ou $3,84 \times 10^{-4}$ M (C).

Padrão	[Nor] M	AbsDiferença [Fe(III), M]		
		A	B	C
1	$1,77 \times 10^{-5}$			
2	$7,08 \times 10^{-5}$	0,1195	0,2170	0,1245
3	$1,24 \times 10^{-4}$	0,2545	0,1945	0,2190
4	$2,12 \times 10^{-4}$	0,4940	0,3620	0,3790
5	$3,19 \times 10^{-4}$	0,8065	0,5705	0,5200
6	$4,25 \times 10^{-4}$	1,0640	0,7965	0,5975
7	$5,31 \times 10^{-4}$	1,4290	0,9572	0,6420
8	$6,37 \times 10^{-4}$	1,7760	1,1710	0,6600
9	$7,08 \times 10^{-4}$	2,0105	1,3015	0,6655

Para a maior concentração em ferro, correspondente a um excesso de, pelo menos, 15 vezes na concentração necessária para complexar toda a NOR em solução (assumindo a relação molar previamente 1:1 encontrada) M, obteve-se um declive igual a $2959,3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, associado a um coeficiente de correlação quadrático (R^2) de 0,9976 ao longo de $1,77 \times 10^{-5}$ M a $7,08 \times 10^{-4}$ M em NOR.

A concentração intermédia de ferro utilizada correspondeu a um excesso de 1,5 vezes sobre a concentração necessária para garantir a complexação de toda a NOR na solução mais concentrada. O declive correspondente foi igual a $1800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, um valor inferior ao registado anteriormente. O valor de R^2 correspondente foi igual a 0,9924, obtido para uma gama de linearidade entre $7,08 \times 10^{-5}$ M e $7,08 \times 10^{-4}$ M. A menor concentração ensaiada não registou a mesma tendência das restantes, o que conduziu a uma gama de linearidade mais estreita do que a indicada anteriormente.

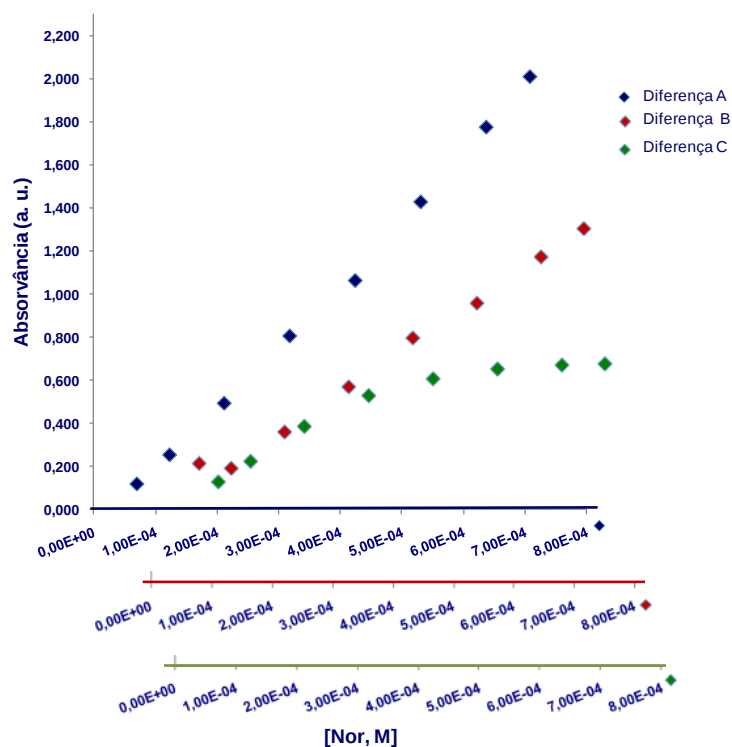


Figura 18 - Representação gráfica do valor de absorvâncias obtido para a diferença entre a absorvância do complexo e a absorvância de Fe(III) para diferentes concentrações de NOR.

A menor concentração de ferro utilizada foi insuficiente para complexar toda a NOR presente em solução, apresentando apenas metade da concentração necessária para reagir com toda a NOR presente na solução padrão mais concentrada. Neste sentido, o valor de declive baixou significativamente, para $838,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, um coeficiente de correlação linear de 0,8780 e o comportamento desviou-se claramente da linearidade para as concentrações mais elevadas (ver Figura 18).

A comparação das três condições ensaiadas sugeriu que a utilização de um excesso elevado em ferro proporciona maiores valores de declive e um comportamento linear de melhor qualidade, ao longo de uma gama de concentrações mais alargada. Neste sentido, apesar da proporção molar entre os componentes do complexo ser igual a 1:1, os ensaios posteriores foram realizados, sempre, com um elevado excesso de Fe(III), já que este favoreceu a extensão da reacção, proporcionando declives mais elevados.

3.3. POSSÍVEIS INTERFERENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Tendo em conta que o sistema sensor em desenvolvimento seria aplicado a amostras de água, procurou-se estudar o efeito de algumas espécies presentes em solução aquosa na formação do complexo corado entre o Fe(III) com a NOR. Neste estudo consideraram-se as

seguintes espécies: Fe(II), Mn(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Pb(II), Hg(II) e Ba(II). Algumas concentrações escolhidas foram seleccionadas com base no decreto-lei 243/2001 [73] para águas ambientais.

O grau de interferência de cada catião foi calculado através do aumento ou diminuição do valor de absorvância relativamente a uma amostra equivalente, preparada sem interferente. Em termos práticos, foram medidas duas soluções paralelamente, uma sem e outra com espécie interferente a um dado nível de concentração (ver tTabela 9). O grau de interferência de cada catião foi determinado através do erro relativo produzido no sinal de absorvância. Os resultados obtidos encontram-se indicados na tabela 9.

Tabela 9 – Valores do erro relativo para a análise de interferentes.

Catiões	Concentração, M	Erro Relativo (%)
Fe(II)	$6,97 \times 10^{-9}$	-3,4
	$5,57 \times 10^{-8}$	-7,9
	$5,57 \times 10^{-7}$	-3,9
Mn(II)	$6,69 \times 10^{-9}$	5,1
	$5,35 \times 10^{-8}$	-18,5
	$5,35 \times 10^{-7}$	16,9
Cu(II)	$7,23 \times 10^{-9}$	3,9
	$3,62 \times 10^{-8}$	2,8
	$3,25 \times 10^{-7}$	7,9
Zn(II)	$1,24 \times 10^{-8}$	-5,6
	$6,84 \times 10^{-8}$	-7,9
	$6,84 \times 10^{-7}$	6,2
Cd(II)	$7,15 \times 10^{-9}$	1,1
	$4,29 \times 10^{-8}$	-8,4
	$4,29 \times 10^{-7}$	14,0
Pb(II)	$6,95 \times 10^{-9}$	-14,6
	$3,48 \times 10^{-8}$	-8,4
	$3,48 \times 10^{-7}$	-7,3
Hg(II)	$6,93 \times 10^{-9}$	0,0
	$1,39 \times 10^{-8}$	1,7
	$4,16 \times 10^{-8}$	5,6
Ba(II)	$1,41 \times 10^{-8}$	-9,6
	$1,06 \times 10^{-7}$	-3,4
	$4,95 \times 10^{-7}$	-4,5

Os erros relativos produzidos pelos vários catiões ensaiados foram positivos e negativos e estavam maioritariamente compreendidos entre -9,6 e +7,9 %. Constituíram excepção os iões Mn(II) Cd(II) e Pb(II). Considerando que estes elementos se encontram em quantidades muito reduzidas nas águas ambientais, não se pressupõe que estes possam vir a constituir uma interferência significativa.

3.4. PREPARAÇÃO DO SENSOR

O sensor teve como base a incorporação de Fe(III) numa membrana de PVC plastificada. O estudo do efeito da quantidade de catião metálico e do tipo/quantidade de solvente mediador na intensidade da coloração formada permitiu identificar a composição mais adequada para a membrana. Para cada ensaio foi efectuado o registo fotográfico seguido da quantificação da cor pelo modelo HSL do programa *Paint* do *Windows*. Para cada sensor foram efectuadas 3 leituras consecutivas, calculando-se a média do valor final.

3.4.1. QUANTIDADE DE Fe(III)

Em termos teóricos, a imobilização de uma maior quantidade de ferro na membrana levaria à percepção de quantidades mais reduzidas de antibiótico. Neste sentido, foram testadas quantidades de reagente imobilizadas muito elevadas, chegando a atingir os 90 % de peso na membrana sensora. A quantidade de ferro na membrana sensora variou, na prática, entre 0,25 e 1,5 g, de acordo com as composições indicadas na Tabela 10, correspondendo a variações compreendidas entre 60 a 90 % (m/m). Foi ainda preparada um membrana sem Fe(III) utilizada para ensaios de controlo.

Tabela 10 Composição de membranas preparadas com quantidades de Fe(III) variáveis

Componentes	Branco	Fe(III)			
		0,25 g	0,50 g	1,00 g	1,50 g
Fe(III) (g)	-	0,252	0,516	1,013	1,538
PVC (g)	0,053	0,051	0,057	0,052	0,052
BES (g)	0,13	0,109	0,146	0,109	0,105
THF (mL)	2	2	2	2	2

O aspecto das membranas obtidas antes da adição de NOR pode ser visualizado na Figura 19 (coluna esquerda). As imagens indicaram que o aumento da concentração de ferro nas membranas fez com que estas passassem de amarelo a cor-de-laranja. Esta alteração de cor foi também acompanhada pela dificuldade incorporação do ferro na membrana de modo homogéneo.

Para cada membrana foram testadas soluções de NOR entre 1×10^{-3} e 1×10^{-5} M, tendo-se efectuado um controlo por ensaio em branco, onde foi depositada uma solução sem antibiótico (Figura 19, coluna direita). Foram também realizadas réplicas de cada ensaio na mesma placa. A comparação visual aponta para melhores resultados para as duas membranas de menor concentração em Ferro (A e D).

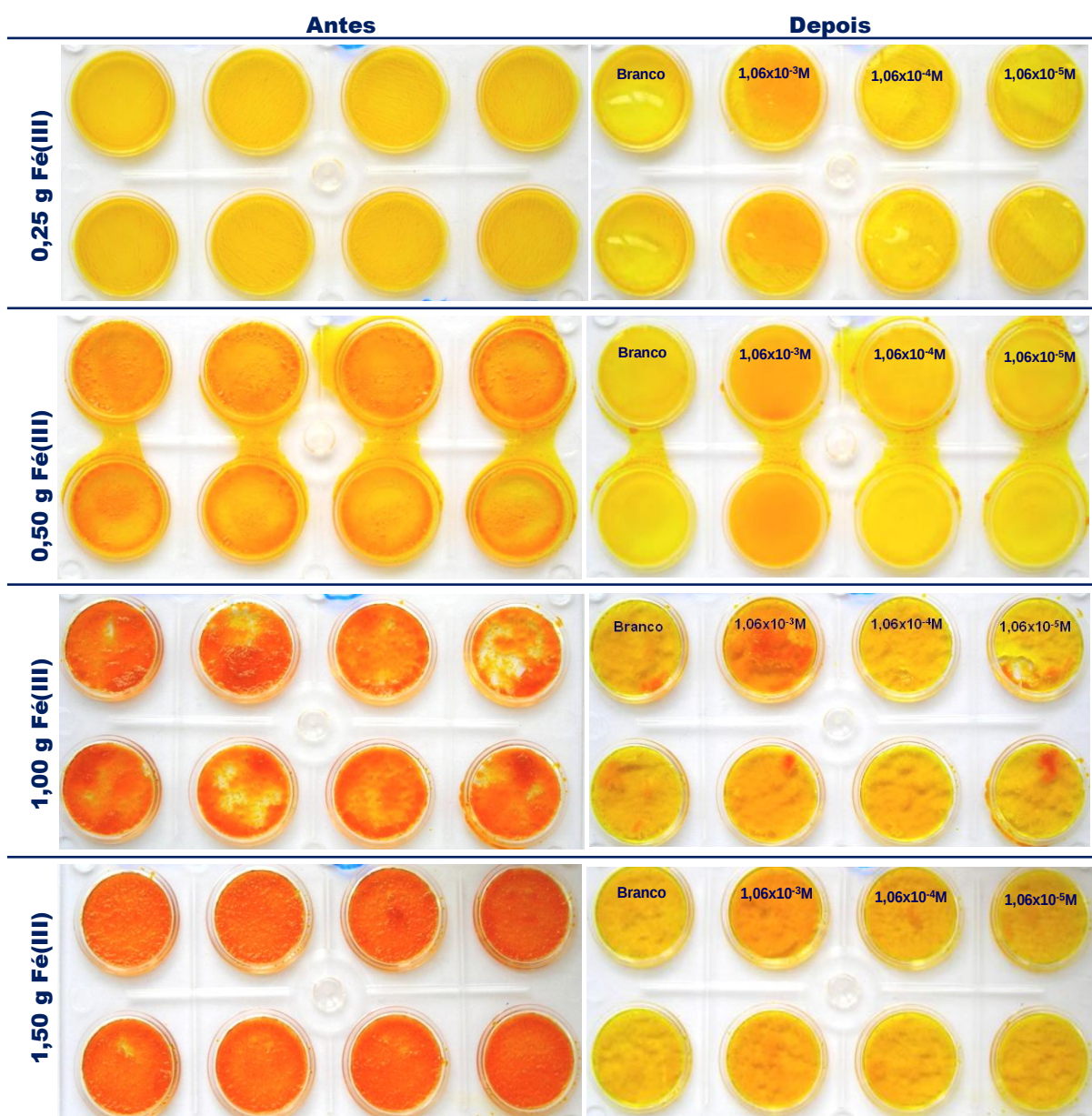


Figura 19 – Membranas sensoras de PVC com diferentes quantidades de ferro, antes e depois da aplicação da solução de antibiótico e réplicas correspondentes.

No sentido de esclarecer de modo mais objectivo o gradiente de mudanças de cor por aumento da concentração de NOR, a imagem de cada célula sensora foi recortada e comparada, de modo contíguo, com as concentrações das células vizinhas (tabela 11). De um modo geral, as diferenças entre os ensaios em branco e as concentrações de NOR iguais a 1×10^{-4} e 1×10^{-5} M não foram muito evidentes. Ficou claro apenas que a presença de concentrações de NOR elevadas, iguais a 1×10^{-2} M, promoveu uma alteração significativa na superfície da membrana sensora. Para além disso, tornou-se evidente a falta de uniformidade da superfície das membranas com as duas concentrações de ferro mais elevadas.

Considerando a importância crucial de uma superfície sensora homogênea para a monitorização rigorosa da sua cor, seleccionou-se a membrana que tivesse a maior quantidade de Fe(III) mas que permitisse a sua completa dissolução. Neste sentido, seleccionou-se a membrana com 0,5 g da espécie metálica para os estudos de optimização posteriores.

Tabela 11 - Gradiente de coloração verificado pela deposição de diferentes concentrações de NOR em cada uma das membranas, preparadas com quantidades de ferro crescentes.

Fe (III), g	NOR			
	$1,0 \times 10^{-3}$ M	$1,06 \times 10^{-4}$ M	$1,06 \times 10^{-5}$ M	—
—				
0,25				
0,50				
1,00				
1,50				

3.4.2. TIPO DE SOLVENTE MEDIADOR

O solvente mediador permite conferir propriedades de borracha à matriz de PVC, uma característica que permite a difusão do analito para o interior da membrana, onde se encontra o reagente Fe(III). Esta difusão depende, porém, das características de permitividade do solvente utilizado e da porosidade da membrana resultante. Além disso, considerando que a membrana contém um teor em ferro muito elevado, este efeito de plastificação da membrana não é, porém, muito perceptível, podendo dar origem a que diferentes solventes mediadores promovam resultados similares.

Os solventes mediadores utilizados no presente estudo foram BES, ONFOE, DOF, DBF, BEF e FGE. As quantidades utilizadas em cada membrana encontram-se indicadas na Tabela 12.

O aspecto das membranas obtidas antes da adição de qualquer solução foi representado na Figura 20 (coluna esquerda). As imagens indicaram que o sal de ferro incorporado não foi solúvel nas membranas de ONFOE, formando aglomerados irregulares visíveis após secagem do THF. De modo contrário, o FGE permitiu a dissolução completa do sal de

metal, apresentando uma coloração laranja intensa. As demais membranas apresentaram um comportamento intermédio.

Tabela 12 - Composição de membranas preparadas com diferentes solventes mediadores

Componentes	BES	ONFOE	DOF	DBF	BEF	FGE
Fe(III) (g)	0,509	0,507	0,505	0,528	0,789	0,504
PVC (g)	0,051	0,05	0,05	0,052	0,051	0,052
Solv. Mediador (g)	0,102	0,105	0,106	0,110	0,117	0,107
THF (mL)	2	2	2	2	2	2

Após adição de soluções de NOR de várias concentrações (ver Figura 20), o gradiente de concentração foi bem visível para membranas preparadas com BES, DOF e DBF. Considerando que o ensaio em branco foi menos uniforme para estes dois últimos solventes mediadores, optou-se pela utilização de BES na preparação das membranas sensoras posteriores.

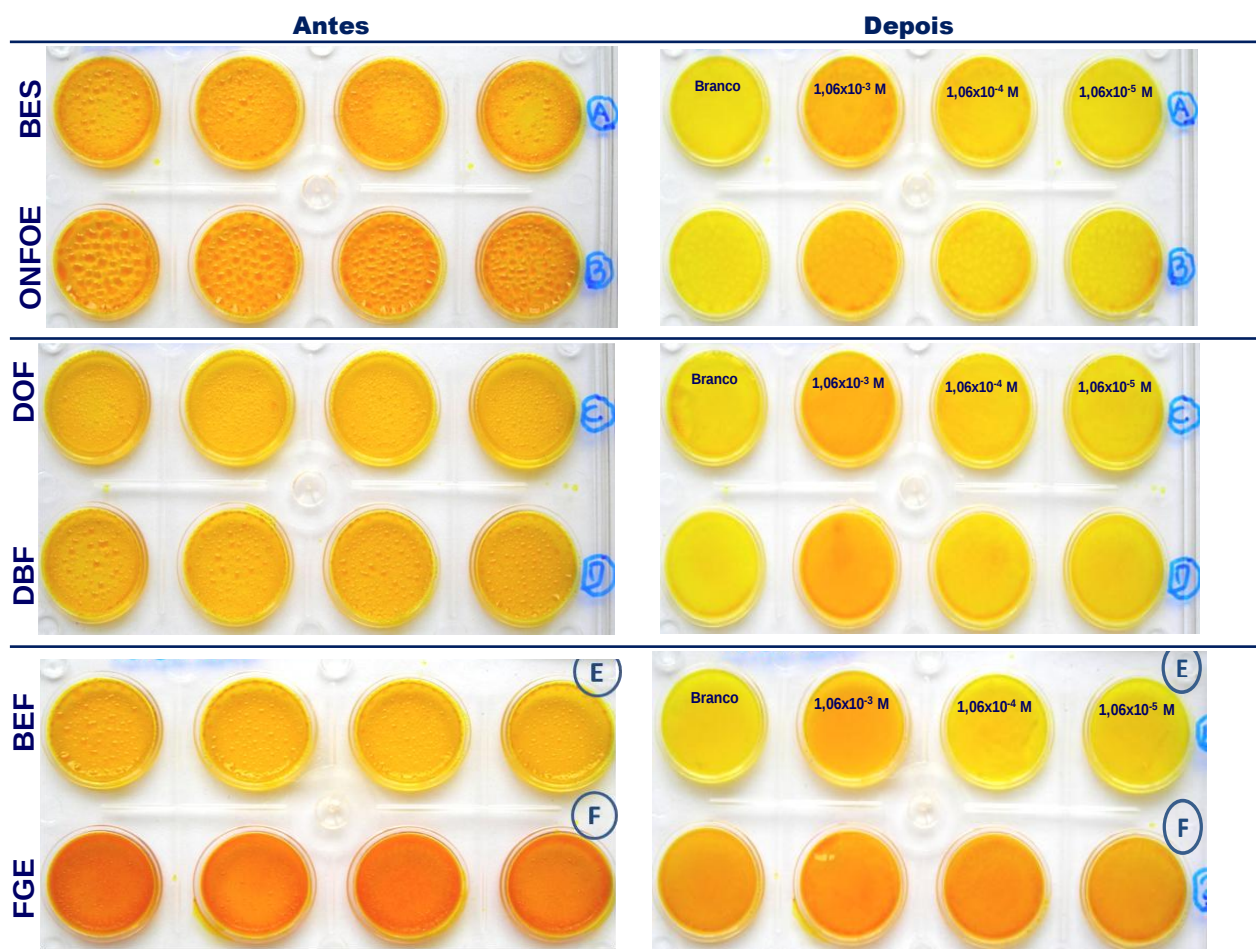


Figura 20 – Membranas sensoras de PVC com diferentes solventes mediadores, antes e depois da aplicação da solução de antibiótico e réplicas correspondentes.

3.4.3. QUANTIDADE DE SOLVENTE MEDIADOR

Nesta fase de otimização do sensor, passou-se ao estudo da possível influência da quantidade de solvente mediador na intensidade da cor do gradiente observado. Tal como referido anteriormente, este composto condiciona as características plastificantes do polímero de PVC, o que, por sua vez, interfere na difusão do composto em estudo para o seu interior.

Para este efeito, fez-se variar a quantidade de solvente mediador incorporado em membranas com 0,500 g de Fe(III) e cerca de 0,050 g de PVC (tabela 13, Figura 21). As quantidades de BES utilizado foram iguais a cerca de 0,020; 0,030; 0,050; 0,100 e 0,150 g.

Tabela 13 - Composição de membranas preparadas com diferentes quantidades de BES.

Componentes	BES				
	0,020 g	0,030 g	0,050 g	0,100 g	0,150 g
Fe(III)	0,524	0,513	0,523	0,51	0,505
PVC	0,053	0,053	0,049	0,05	0,053
BES	0,018	0,028	0,054	0,104	0,163
THF (mL)	2	2	2	2	2

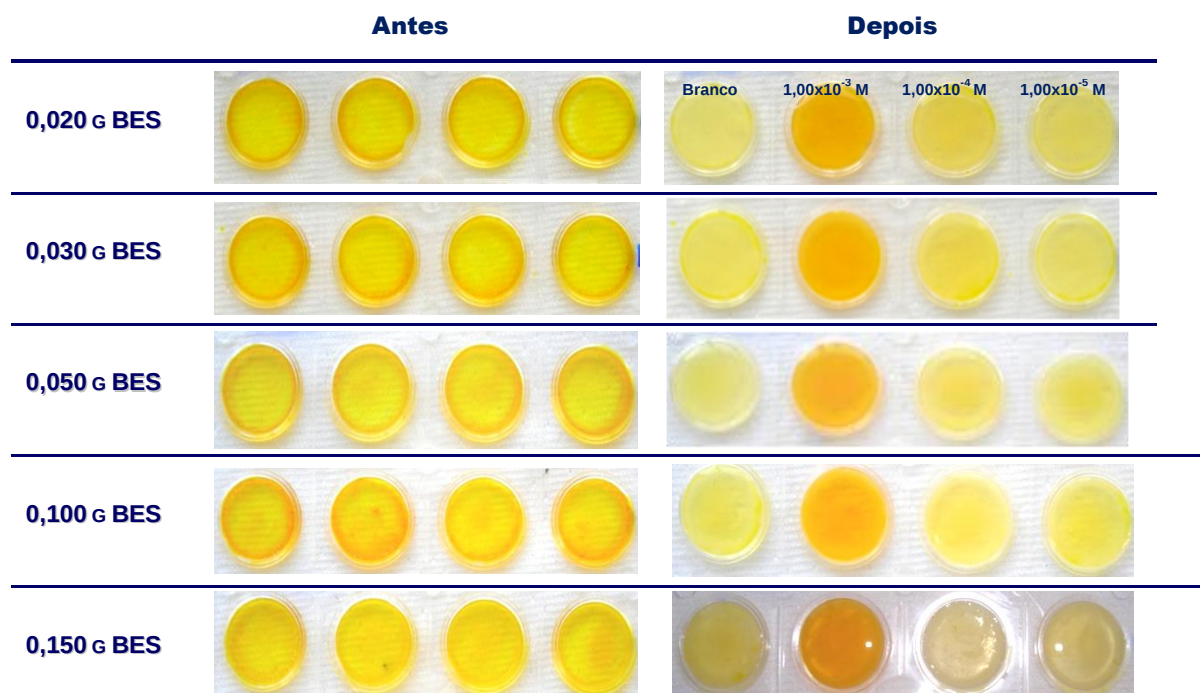
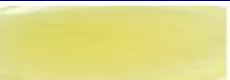


Figura 21 – Membranas sensoras de PVC com diferentes quantidades de BES, antes e depois da aplicação da solução de antibiótico.

No sentido de esclarecer de modo mais objectivo o gradiente de mudanças de cor por variação da quantidade de BES, a imagem de cada célula sensora foi recortada e

comparada com as demais concentrações (Tabela 14). De um modo geral, as diferenças de gradiente mais evidentes foram encontradas em membranas com as maiores quantidades de BES. Selecionou-se por isso a membrana que, com a menor quantidade de solvente mediador originava o gradiente mais alargado, tendo-se utilizado posteriormente membranas com 0,100 g de BES.

Tabela 14 - Gradiente de coloração verificado pela deposição de diferentes concentrações de NOR em cada uma das membranas, preparadas com quantidades de BES crescentes.

BES (III), g	NOR			
	$1,0 \times 10^{-3}$ M	$1,06 \times 10^{-4}$ M	$1,06 \times 10^{-5}$ M	—
0,020				
0,030				
0,050				
0,100				
0,150				

3.5. CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DO SENSOR ÓPTICO

O sensor óptico foi constituído com a membrana ótima seleccionada, composta por cerca de 0,500 g de Fe(III), 0,050 g de PVC e 0,100 g de BES. A composição média das membranas preparadas nesta fase encontra-se indicada na Tabela 15. A caracterização do comportamento analítico desta membrana foi efectuada com base na deposição de uma gama alargada de concentrações de NOR, equidistantes entre si e iguais a $1,00 \times 10^{-2}$ M, $4,00 \times 10^{-3}$ M; $2,00 \times 10^{-3}$ M; $1,00 \times 10^{-3}$ M; $5,00 \times 10^{-4}$ M e $5,00 \times 10^{-5}$ M.

Tabela 15 – Composição mássica das membranas sensoras seleccionadas.

	$m_{teórica}$	m_{Real}
Fe(III) (g)	0,500	0,508
PVC (g)	0,050	0,053
BES (g)	0,100	0,105
THF (mL)	2	2

Na Figura 22 encontra-se representado o gradiente de cor obtido em função da concentração de NOR. Os resultados obtidos evidenciaram a variação da intensidade de coloração da solução à medida que a concentração de NOR aumentou, notando-se ainda

uma ligeira diferença entre a concentração de $5,00 \times 10^{-5}$ M e o ensaio em branco, realizado pela deposição de apenas solução tampão.

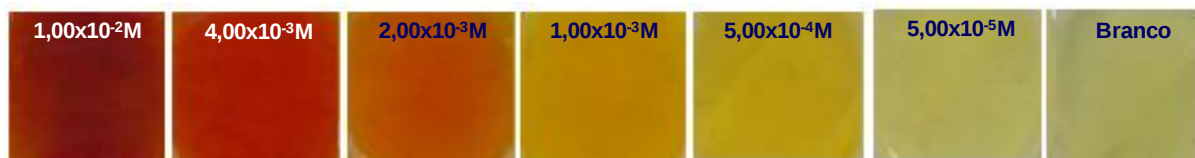


Figura 22 – Gradiente de coloração para a curva de calibração de NOR com as membranas sensoras seleccionadas.

Para o traçado da curva de calibração foram realizadas 3 leituras consecutivas de coordenadas do modelo HSL, calculando-se a média e desvio padrão correspondente. Os valores dessas coordenadas encontram-se indicados na Tabela 16 e foram representados em função da concentração de NOR.

Tabela 16 - Valores das coordenadas de cada um dos sensores.

Conc., M	Log(C)	Ton	Sat	Lum	Ton+Lum
0		37,67	79±0,707	119,3±2,12	157,0
$5,00 \times 10^{-5}$	-4,30	36,7±0,707	90±0,707	123±2,82	159,7
$5,00 \times 10^{-4}$	-3,30	32,33	210,7±2,12	91,33	123,7
$1,00 \times 10^{-3}$	-3,00	27,33	240,00	88±0,707	115,3
$2,00 \times 10^{-3}$	-2,70	14,33	240,00	82,67	97,0
$4,00 \times 10^{-3}$	-2,40	5,33	237,00	79,00	84,3
$2,00 \times 10^{-2}$	-1,70	3,33	184,7±2,83	61,3±1,41	64,7

Tal como seria de esperar, os resultados obtidos não apontaram para uma tendência linear entre a concentração e qualquer uma destas coordenadas, pelo que se optou por testar várias abordagens de tratamento matemático sobre os valores das coordenadas. Quando se utilizou como medida experimental a soma da tonalidade com a luminosidade obteve-se um comportamento linear em função do logaritmo da concentração de NOR. Esta tendência encontra-se representada na Figura 23. O declive resultante foi negativo.

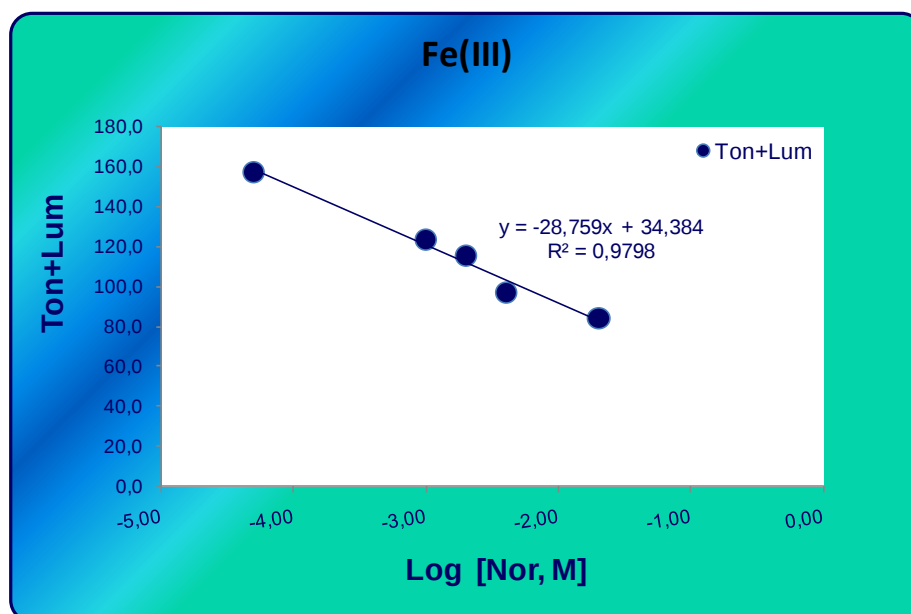


Figura 23 - Curva de calibração para o sensor otimizado.

3.6. INTERFERÊNCIA DE OUTROS ANTIBIÓTICOS

Considerando a semelhança estrutural entre a NOR e outros antibióticos utilizados para fins veterinários no sector da aquacultura, optou-se pela monitorização da interferência de alguns destes compostos. Este estudo foi realizado pela deposição na mesma placa de soluções de NOR (1), tetraciclina (2), sulfadiazina (3), clorpromazina (4), enrofloxacin (5), trimetoprim (6) e oxitetraciclina (7), todas estas com uma concentração igual a $1,00 \times 10^{-3}$ M, preparadas de acordo com os valores indicados na Tabela 17.

Tabela 17 – Dados para preparação das soluções de antibiótico interferente.

Composto	m_{real} (g)	M_r (g L^{-1})	V (L)	C_{real} (mol L^{-1})
NOR	0,0080	319,3	0,025	$1,00 \times 10^{-3}$
Tetraciclina	0,0130	480,9	0,025	$1,08 \times 10^{-3}$
Sulfadiazina	0,0080	272,3	0,025	$1,18 \times 10^{-3}$
Clorpromazina	0,0100	355,3	0,025	$1,13 \times 10^{-3}$
Enrofloxacin	0,0090	359,4	0,025	$1,00 \times 10^{-3}$
trimetoprim	0,0070	290,32	0,025	$9,64 \times 10^{-4}$
Oxitetraciclina	0,0130	496,89	0,025	$1,05 \times 10^{-3}$

A NOR forneceu o resultado habitual (Figura 24), tendo sido este diferente de qualquer outro resultado obtido. Apesar de pertencer ao mesmo grupo químico que a NOR, a enrofloxacin forneceu um resultado muito diferente do da NOR, de tom vermelho escuro. As duas tetraciclinas (oxitetraciclina e tetraciclina) apresentaram resultados muito próximos entre si,

de tom castanho. A sulfadiazina e o trimetoprim, usadas na terapêutica humana e veterinária em associação, apresentaram-se muito próximos ao controlo (branco), sugerindo que não reagiram com o Fe(III) ou que a extensão de reacção foi muito reduzida para ser perceptível. A clorpromazina apresentou uma coloração rosa, muito diferente das demais cores observadas.

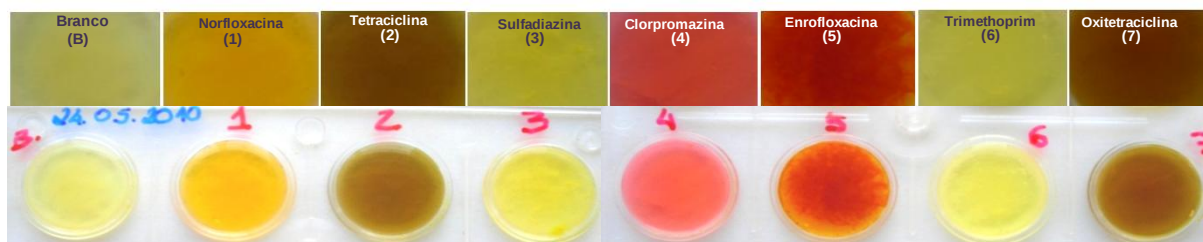


Figura 24 – Coloração de cada sensor após deposição de várias soluções interferentes em placa e a composição da imagem em *Paint* para comparação visual da cor.

Os valores das coordenadas das cores obtidas para cada composto encontram-se indicados na tabela 18. Os resultados confirmam as diferenças muito significativas com a NOR, tal como sugerido na figura anterior. Neste sentido, a presença de qualquer um daqueles compostos na amostra a analisar deve ser rapidamente detectada.

Tabela 18 - Valores das coordenadas do sistema HSL para os vários antibióticos interferentes.

Componentes	Tonalidade	Saturação	Luminosidade	Ton+Lum
Branco	37,3	95,7±4,24	115,3±1,41	152,6
Nor	28,0	240,0	88,0	116,0
Tetraciclina	22,0	222±9,19	49,7±1,41	71,7
Sulfadiazina	37±0,707	174,7±1,41	93±2,12	130,0
Chloropromazina	4,7	150,7±1,41	108,7±2,12	113,4
Enrofloxacin	4,3±0,707	229±4,94	68,7	73,0
trimetoprim	38,0	132,3±0,707	104,3	142,3
Oxitetraciclina	17±1,41	240,0	43,7	60,7

3.7. PREPARAÇÃO DE UM ARRAY DE SENSORES

O procedimento analítico com base num único sensor óptico poderá comprometer severamente a exactidão/precisão dos resultados obtidos. Para minorar esta limitação, optou-se pela preparação de um array de sensores, tendo-se usado para este efeito os restantes metais capazes de complexar com alguma relevância a NOR. Neste sentido, o procedimento de preparação do sensor sólido e a sua optimização foi aplicado a outras espécies metálicas, para além do Fe(III), tais como o aluminon, Cu(II) e Mn(II). Estas

espécies foram aquelas que, a seguir ao Fe(III), ofereceram uma resposta mais intensa à presença de NOR nos ensaios preliminares iniciais.

A conjugação de membranas com as quatro espécies imobilizadas numa mesma placa constituiu, assim, um *array* de sensores para a despistagem de NOR em águas de aquacultura. Esse array foi representado na Figura 25 e apresenta, da esquerda para a direita, as espécies redox Fe(III), aluminon, Cu(II) e Mn(II), respectivamente, imobilizadas em matriz de PVC plastificada por BES.



Figura 25 – Array de sensor óptico base

A curva de calibração de cada um dos metais acima referidos foi efectuada com base na deposição de várias soluções padrão de NOR de concentrações iguais a $1,00 \times 10^{-2}$ M, $4,00 \times 10^{-3}$ M, $2,00 \times 10^{-3}$ M, $1,00 \times 10^{-3}$ M, $5,01 \times 10^{-4}$ M e $5,01 \times 10^{-5}$ M, e um branco, identificando-se para cada metal um gradiente de cores diferente (Figura 26).

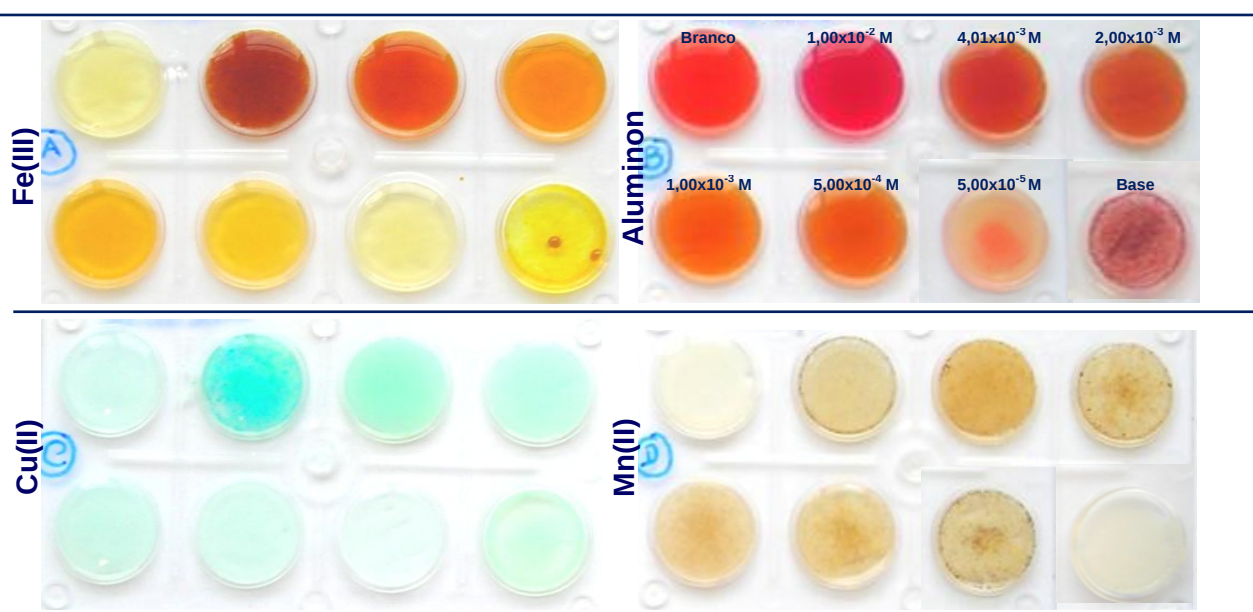


Figura 26 – Membranas sensoras de PVC com diferentes solventes mediadores, antes e depois da aplicação da solução de antibiótico e réplicas correspondentes.

Os resultados obtidos foram manipulados após fotografia (Tabela 19), pelo programa de cores PAINT, utilizando-se as coordenadas da Tonalidade, Saturação e Luminosidade. Os

valores de coordenadas obtidos nestes ensaios encontram-se indicados na tabela 20. Os resultados das análises apresentadas corresponderam sempre à média de, pelo menos, três leituras em cada sensor. A precisão dos resultados foi calculada por intermédio do desvio padrão correspondente.

Tabela 19 - Gradiente de coloração para cada um dos sensores do *array*.

REAGENTE	$1,00 \times 10^{-2}$ M	$4,01 \times 10^{-3}$ M	$2,00 \times 10^{-3}$ M	$1,00 \times 10^{-3}$ M	$5,00 \times 10^{-4}$ M	$5,00 \times 10^{-5}$ M	Branco
Fe(III)							
Aluminon							
Cu(II)							
Mn(II)							

Os valores de tonalidade + luminosidade variaram linearmente com o logaritmo da concentração. O único elemento do *array* que não respeitou este comportamento foi aquele baseado no metal Cu(II) (Figura 27). Estas unidades sensoras variaram linearmente com a luminosidade da solução de NOR adicionada à membrana.

Tabela 20 – Valores das coordenadas de cor referente ao sensores de Fe(III), aluminon, Cu(II) e Mn(II).

Espécie	Conc.	Log(C)	Ton	Sat	Lum	Ton+Lum
Fe(III)	0		38,00	149,33±0,707	172,67	210,7
	$5,00 \times 10^{-5}$	-4,30	36,33	167,33	179,00	215,3
	$5,00 \times 10^{-4}$	-3,30	31,00	207,00	137,00	168,0
	$1,00 \times 10^{-3}$	-3,00	26,33	208,33	137,33	163,7
	$2,00 \times 10^{-3}$	-2,70	17,00	209,00	137,00	154,0
	$4,00 \times 10^{-3}$	-2,40	4,67	161,33	127,33	132,0
	$2,00 \times 10^{-2}$	-1,70	1,67	101,33±1,41	103,33	105,0

Tabela 20 – Valores das coordenadas de cor referente ao sensores de Fe(III), aluminon, Cu(II) e Mn(II) (cont.).

Espécie	Conc.	Log(C)	Ton	Sat	Lum	Ton+Lum
Aluminon	0		0,00	191,0±0,707	140,0±0,707	140,0
	5,00x10 ⁻⁵	-4,30	9,33	169,0±0,707	150,67	160,0
	5,00x10 ⁻⁴	-3,30	9,0±0,707	168,33	128,33	137,3
	1,00x10 ⁻³	-3,00	10,00	180,67	130,33	140,3
	2,00x10 ⁻³	-2,70	6,33	114,67	121,67	128,0
	4,00x10 ⁻³	-2,40	0,67	118,0±1,41	123,33	124,0
	2,00x10 ⁻²	-1,70	233,33	151,67	124,33	357,7
Cu(II)	0		107,7±0,707	98,7±0,707	203,70	311,3
	5,00x10 ⁻⁵	-4,30	106,30	63,00	216,00	322,3
	5,00x10 ⁻⁴	-3,30	107,00	100,00	206,00	313,0
	1,00x10 ⁻³	-3,00	105,70	106,00	200,00	305,7
	2,00x10 ⁻³	-2,70	105,00	154,00	199,70	304,7
	4,00x10 ⁻³	-2,40	103±0,707	163,70	185,70	288,7
	2,00x10 ⁻²	-1,70	115,70	202,70	137,00	252,7
Mn(II)	0		37±1,41	62±2,21	208±0,707	245,0
	5,00x10 ⁻⁵	-4,30	35,30	59±1,41	200,7±0,707	236,0
	5,00x10 ⁻⁴	-3,30	26,30	132,00	148±0,707	174,3
	1,00x10 ⁻³	-3,00	24,70	132,00	156,00	180,7
	2,00x10 ⁻³	-2,70	26±0,707	112±1,41	140,70	166,7
	4,00x10 ⁻³	-2,40	26,00	129,00	143,00	169,0
	2,00x10 ⁻²	-1,70	27±0,707	105±1,41	146,00	173,0

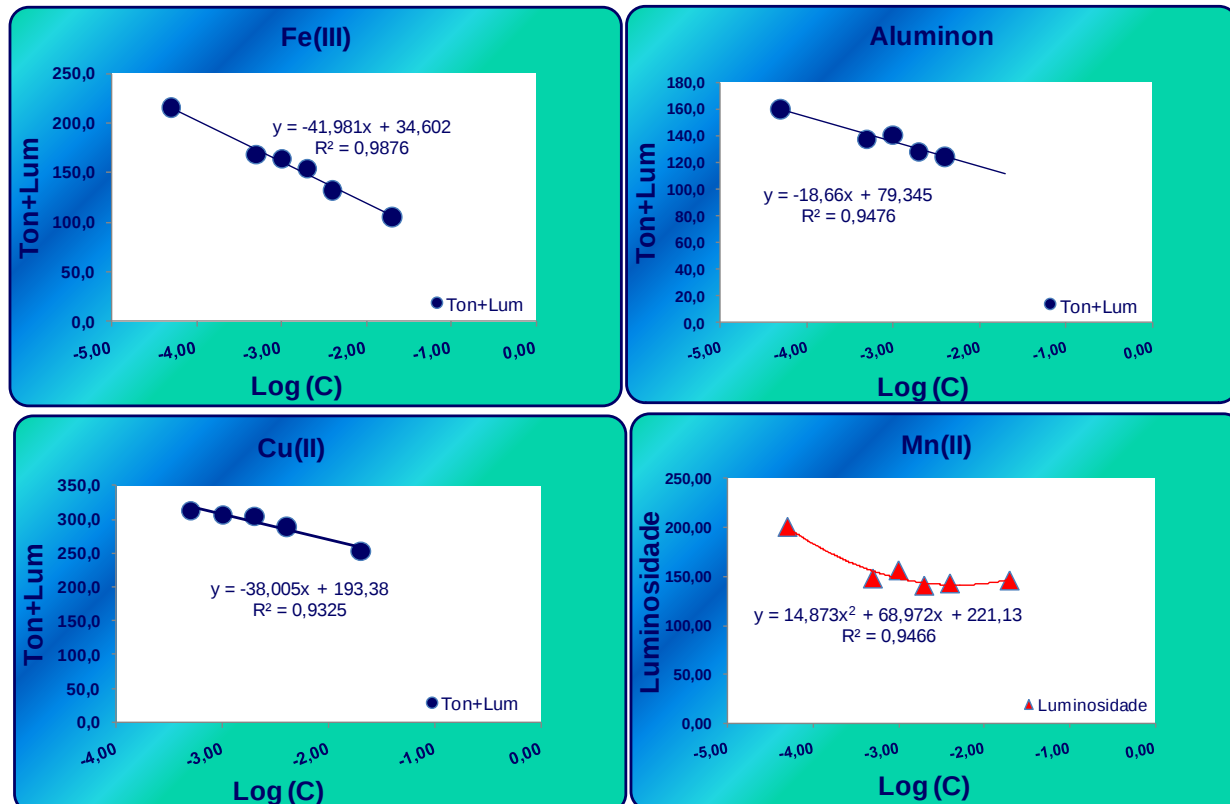


Figura 27 - Curva de calibração para o sensor de Fe(III), aluminon, Cu(II) e Mn(II), utilizando em ordenada a tonalidade e luminosidade ou apenas a luminosidade.

3.8. ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A aplicabilidade do método proposto foi averiguada através da aplicação do sistema desenvolvido à análise de amostras de águas ambientais. A preparação de um array sensores foi efectuada com base na tabela indicada de seguida. Para controlo, foram testadas ao mesmo tempo, três soluções padrão de $1,00 \times 10^{-3}$ M, $2,00 \times 10^{-3}$ M e $5,00 \times 10^{-3}$ M e um branco. Os sensores tiveram os seguintes metais incorporados: Fe(III), aluminon, Cu(II) e Mn(II). As amostras foram dopadas com NOR para um teor final igual a cerca de $2,00 \times 10^{-3}$ M e aplicadas sobre as membranas (Figura 28).

Tabela 21 - Preparação do sensor nas condições óptimas

Amostras	Fe(III)	Aluminon	Cu(II)	Mn(II)
Metal (g)	0,538	0,486	0,497	0,479
PVC(g)	0,05	0,05	0,049	0,051
BES (g)	0,108	0,101	0,103	0,105
THF (mL)	2	2	2	2



Figura 28 – Imagem da deposição de água contaminada nas membranas desenvolvidas.

Para cada um dos sensores traçou-se uma curva de calibração. Os resultados obtidos (ver Tabela 22 e Figura 29) foram manipulados após aquisição da imagem digital, utilizando as coordenadas do modo indicado anteriormente. A tabela 23 revela o gradiente formado para cada um dos diferentes metais incorporados.

Tabela 22 - Valores das coordenadas de cor referente ao sensor de Fe(III), aluminon, Cu(II) e Mn(II).

Espécie	Conc.	Log(C)	Ton	Sat	Lum	Ton+Lum
Fe(III)	0		36,67	110,00	156±0,707	192,7
	$1,00 \times 10^{-3}$	-3,00	28,33	147,00	122,67±0,707	151,0
	$2,00 \times 10^{-3}$	-2,70	20,67	169,67±0,707	112,00	132,7
	$5,00 \times 10^{-3}$	-2,30	5,67	129,70	104,00	109,7
	Amostra 1		22,0	207,7	108,7	130,7
	Amostra 2		21,3	205±0,707	107,0	128,3

Tabela 22 - Valores das coordenadas de cor referente ao sensor de Fe(III), aluminon, Cu(II) e Mn(II) (cont.).

Espécie	Conc.	Log(C)	Ton	Sat	Lum	Ton+Lum
Aluminon	0		237,33	126±1,41	95,33±0,707	332,7
	1,00x10 ⁻³	-3,00	237±0,707	113,67	86,33	323,3
	2,00x10 ⁻³	-2,70	238,67	106,33±0,707	89,67±0,707	328,3
	5,00x10 ⁻³	-2,30	233,67	73,67	83±1,41	316,7
	Amostra 1		239,0	136,7	88,0	327,0
	Amostra 2		235,9	130,7	102,7±0,707	338,6
Cu(II)	0		135,00	107,00	194,33	329,3
	1,00x10 ⁻³	-3,00	127±0,707	95,33	186,00	313,0
	2,00x10 ⁻³	-2,70	119,33	83±2,12	172,33	291,7
	5,00x10 ⁻³	-2,30	125,67	109,33±4,24	157,67	283,3
	Amostra 1		119,7	116,3	173,7	293,4
	Amostra 2		123±0,707	117±2,12	177,7±0,707	300,7
Mn(II)	0		142,00	57,33	196,33±0,707	338,3
	1,00x10 ⁻³	-3,00	141,33±1,41	31,33±3,53	199,30	340,7
	2,00x10 ⁻³	-2,70	28,33±0,707	60±2,12	150±2,12	178,3
	5,00x10 ⁻³	-2,30	22,67	56,33	139,33	162,0
	Amostra 1		23,3±0,707	68,3±0,707	160,7±0,707	184,0
	Amostra 2		26±1,41	56,7±0,707	166,7±0,707	192,7

Os resultados das análises apresentados corresponderam sempre à média, de pelo menos, três leituras em cada sensor. A precisão dos resultados foi calculada por intermédio do desvio padrão correspondente.

Tabela 23 - Gradiente de coloração no array e amostras contaminadas com NOR.

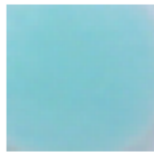
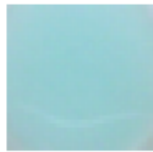
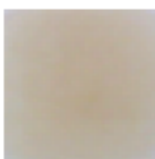
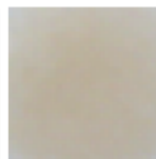
Reagente	5,00x10 ⁻³ M	2,00x10 ⁻³ M	1,00x10 ⁻³ M	Branco	Amostra 1	Amostra 2
Fe(III)						
Aluminon						
Cu(II)						

Tabela 23 - Gradiente de coloração no array e amostras contaminadas com NOR (cont.).

Reagente	5,00x10 ⁻³ M	2,00x10 ⁻³ M	1,00x10 ⁻³ M	Branco	Amostra 1	Amostra 2
Mn(II)						

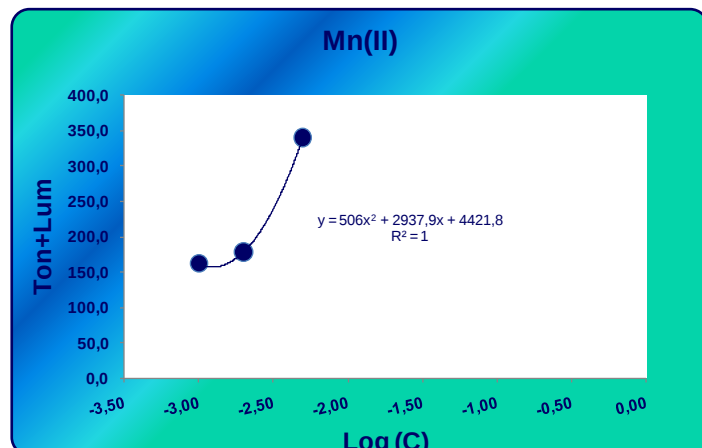
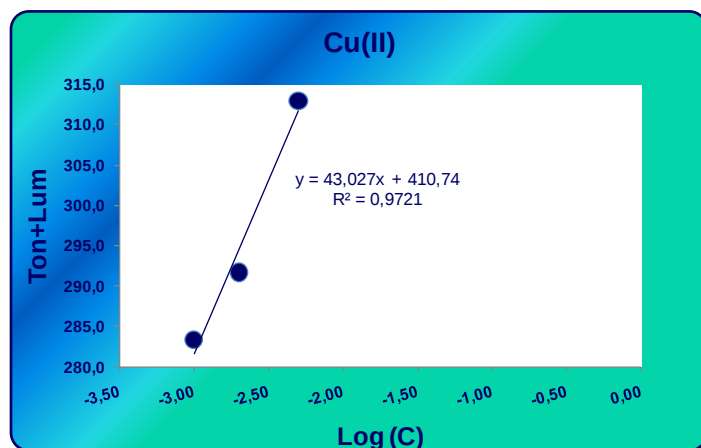
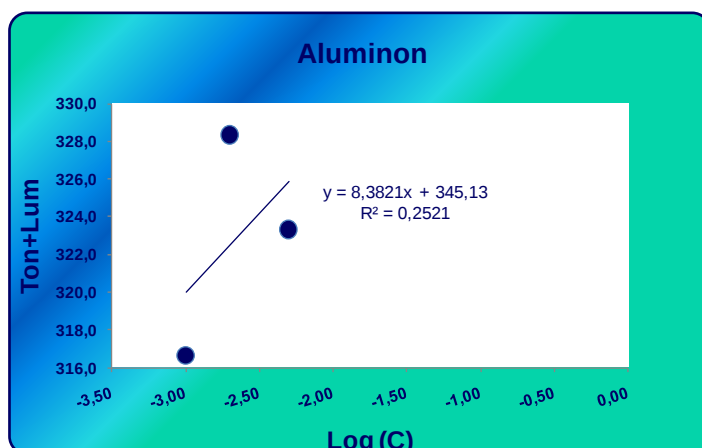
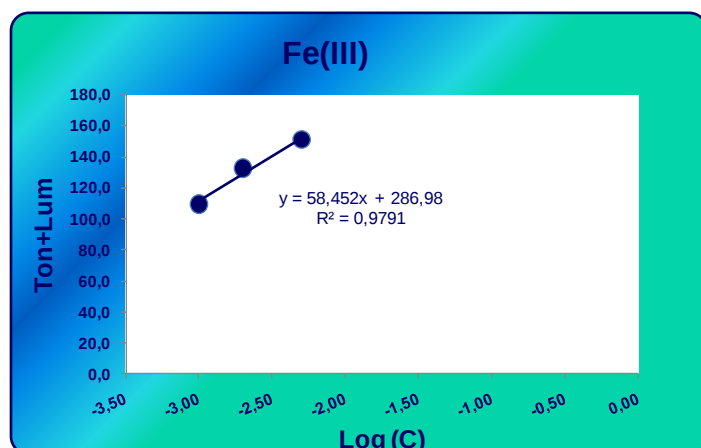


Figura 29 - Curva de calibração para o array de sensores.

Pela equação da recta e através do valor da tonalidade e/ou luminosidade (Figura 29) para as amostras 1 e 2 calculou-se a concentração com base em cada uma das membranas. Relativamente ao Fe(III) obtiveram-se as concentrações $2,12 \times 10^{-3}$ M para a amostra 1 e $1,93 \times 10^{-3}$ M para a amostra 2, encontrando-se os dois valores muito próximo dos valores reais. O desvio relativo foi igual a 10.0% para um erro relativo de 6.15% na amostra 1 e de igual a 3.56% na amostra 2.

Para o sensor de aluminon obteve-se um R^2 muito reduzido (0,2521) assim também como o declive (0,3821). Os valores de concentração obtidos foram iguais a $6,87 \times 10^{-3}$ M para a

amostra 1 e a $166,3 \times 10^{-3}$ M para a amostra 2. Os resultados obtidos indicam que as concentrações das amostras nem são próximas uma da outra, nem sequer próximas do valor real. Apresentando um desvio relativo de 95.9% e um erro de 24.4% e de 82.22% para as amostras 1 e 2 respectivamente.

No sensor de Cu(II) incorporado, obtiveram-se valores para as concentrações das amostras 1 e 2 de $1,86 \times 10^{-3}$ M e de $2,77 \times 10^{-3}$ M respectivamente. Apresentaram um desvio relativo de 32.8% e um erro de 7% e de 38.5% para as amostras 1 e 2 respectivamente.

Para o Mn(II) a equação que mais se ajustou à série de dados respectiva foi uma equação de 2º grau. Sendo assim os valores das concentrações obtidas para as amostras 1 e 2 foram de $2,12 \times 10^{-3}$ M e de $2,298 \times 10^{-3}$ M, respectivamente, o que se poderá dizer que são muito próximas uma da outra e também muito próximas da concentração real. O desvio relativo correspondente foi igual a 7.74% e o erro foi igual a 6.00% para a amostra 1 e 14.9% para a amostra 2.

Comparando os resultados obtidos para cada um dos sensores, podemos verificar que se obtiveram para o sensor do Fe(III) e o sensor de Mn(II) valores de concentração muito próximas das reais. Este sensores poderão vir a ser aplicados numa base de rotina ao controlo dos níveis de NOR aquando da sua aplicação no meio aquático. É importante referir que seriam necessários estudos adicionais, ou de optimização do sensor, ou de pré-concentração da amostra, para viabilizar a aplicação destes sensores ao controlo da contaminação antimicrobiana do meio aquático.

3.9. ANÁLISE TÉCNICO-ECONÓMICA

A aplicação do método proposto na despistagem de NOR numa base de rotina pressupõe que o seu custo seja reduzido. Neste sentido, é importante efectuar uma análise dos custos inerentes à sua implementação.

A realização de uma calibração baseada em 3 padrões de controlo e um branco e a análise de 4 amostras pressupõe a preparação de 8 membranas, que perfazem no total o conteúdo de uma placa com 8 poços. O custo associado à preparação dessa placa seria igual a 1,383 €, considerando os valores estimados na Tabela 24. Para as soluções padrão estima-se um gasto 0,014 € de NOR (91 €/5g) pelo consumo da massa total de $8,14 \times 10^{-4}$ g de reagente na aplicação de 150 µL de soluções padrão de 1×10^{-3} , 5×10^{-3} e 1×10^{-2} M. Neste sentido, o conjunto de calibração e análise de 4 amostras pressupõe um gasto de cerca de 1,4 €. O custo associa a cada amostra seria, por isso, igual a 0,35 €. É importante referir que este valor seria tanto menor quanto maior o número de análises efectuadas.

Tabela 24 - Gastos de calibração e análise de 4 amostras

Reagentes	Aquisição	Membranas por placa	
		Consumo	Custo (€)
PVC	21 €/250 g	0,025 g	0,0021
BES	36 €/5 ml	0,050 g	0,2600
FeCl ₃	39 €/Kg	0,250 g	0,0098
THF	111 €/L	1,00 mL	0,1110
Placa	1 €/unidade	1 unidade	1,00
		Total	1,383

Relativamente a pessoal analista, estima-se um gasto de cerca de 5 €, que envolve o tempo de 30 minutos para a preparação da placa de 8 membranas e análise das 4 amostras. O método proposto não requer gastos de manutenção. Relativamente aos custos associados à produção de resíduos considera-se difícil definir uma estimativa de gastos. A membrana foi tratada como material descartável mas a placa de 8 poços poderia ser reutilizada.

Para este estudo não foram considerados consumos de água e de luz já que estes não apresentavam contadores separados dos restantes consumos realizados no laboratório. Os gastos gerais do edifício ou com o material de laboratório corrente também não foram considerados pela ausência de valores específicos para o laboratório em causa.

Esta metodologia não apresenta custos de manutenção já que as membranas são aplicadas e descartadas após a sua utilização. Não foram efectuados testes de recuperação do sensor, mas pressupõe-se que a resposta da membrana a uma segunda amostra será de menor intensidade, por perda do reagente complexado na primeira medida. A aquisição da imagem por máquina fotográfica digital poderá, no futuro, ser substituída por uma tira de comparação visual, equivalente à estratégia utilizada comercialmente para triagem do pH.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a preparação de uma membrana sensora para detecção óptica/visual da presença de NOR. Entre várias espécies avaliadas, o Fe(III) foi aquela que complexou com o antibiótico em maior intensidade, sendo esta complexação na proporção de 1:1 e favorecida a pH 3.

A composição considerada mais adequada para a membrana sensora foi igual a 0,5 g de catião Fe(III), 0,05 g de PVC, 0,10 g de BES (solvente mediador) e 2 mL de THF. Esta composição foi encontrada após optimização da quantidade da espécie metálica e do tipo/quantidade de solvente mediador. A tonalidade + luminosidade promovida neste sensor por soluções padrão de NOR foi linear com o logaritmo da concentração do padrão.

A interferência de vários antibióticos, nomeadamente tetraciclina, sulfadiazina, a clorpromazina, a enrofloxacina, o trimetoprim e a oxitetraciclina, não foi considerada relevante, porque originavam cores diferentes da produzida pela NOR ou porque não se complexavam com o metal numa extensão que permitisse visualizar essa reacção.

Foi possível constituir um *array* de sensores através da replicação das membranas seleccionadas com base noutras espécies complexantes. A aplicação deste conjunto à análise de amostras de águas ambientais foi efectuada com sucesso no caso de membranas com as espécies Fe(III) e Mn(II).

Em suma, o método proposto permitiu a despistagem rápida e eficaz da presença de um antibiótico, permitindo ainda o seu doseamento a um baixo custo. Numa perspectiva de

rotina, este método relevou-se muito mais rápido e mais barato do que os demais métodos descritos na literatura para este efeito.

Outros estudos complementares consideram-se, porém, relevantes, no sentido de otimizar diversos aspectos dos sensores aqui descritos, nomeadamente:

- (i) Avaliar com mais detalhe o efeito de interferência dos vários antibióticos no sensor de manganês
- (ii) Procurar mais espécies capazes de formar complexos corados com a NOR a concentrações inferiores de analito
- (iii) Constituir um *array* baseado num maior número de reacções no sentido de aumentar a exactidão das amostras.

Estes estudos fazem parte das perspectivas futuras deste trabalho.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Regulamento (CE) nº 2792/1999 do Conselho, de 17 de Dezembro de 1999, que define os critérios e condições das acções estruturais no sector das pescas, JO L 337 de 30/12/1999, 29-33.
- [2] Comunicação da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu. “Estratégia de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura Europeia”. <http://eur-lex.europa/> (acedido a 05 de Julho de 2010).
- [3] LIMACRIA. Vale do Lima Aquacultura [como avaliar a sua ideia de negócio]. EQUAL, 30pp.
- [4] R. Subasinghe, D. Soto, J. Jia, 2009. Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, (1): 2–9.
- [5] B. Koonse, 2007. *Good Aquacultural Practices Program*. University of Maryland.
- [6] R.J. Goldberg, M.S.Elliott, R.L.Naylor, 2001. Marine Aquaculture in the United States, environmental impacts and policy options. *Pew Oceans Commission*, Arlington, Virginia.
- [7] A.E.S. Kools, F.J. Moltmann, T. Knacker, 2008. Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50 (1): 59-65.
- [8] A.B.A. Boxall, 2004. The environmental side effects of medication, *EMBO reports*, 5 (12): 1110-1116.
- [9] WHO World Health Report, <http://www.who.int/whr/en/index.html>, acedido em 3 de Julho de 2010.

- [10] J.P. Louie, L.M. Bell, 2002. Appropriate use of antibiotics for common infections in an era of increasing resistance. *Appropriate Emergency Medicine Clinics of North America*, 20 (1): 69-91.
- [11] A. Virk, J.M. Steckelberg, 2000. Clinical aspects of antimicrobial resistance. *Mayo Clinic Proceedings*, 75 (2): 200-214.
- [12] K. Dost, D.C. Jones, G. Davidson, 2000. Determination of sulfonamides by packed column supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometric detection. *Analyst*, 125 (7): 1243-1247.
- [13] R.J. Carmen, R.L. Van Tassell, R. D. Willens, 1993. The normal intestinal microflora: ecology, variability and stability. *Veterinary and Human Toxicology. Veterinary and Human Toxicology*, 35: 11-14.
- [14] J.L.S. Rodríguez, M.E.D. Garcia, 2001. Fluorescent competitive flow-through assay for chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *Biosensors & Bioelectronics*, 16 (9-12): 955-961.
- [15] K. Yano, I. Karube, 1999. Molecularly imprinted polymers for biosensor applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 18 (3): 199-204.
- [16] R. Hirsch, T.A Ternes, K.Haberer, 1998. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 815 (2): 213-223.
- [17] A.C.Alder, C.S.McArdell, E.M.Golet, S.Ibric, E.Molnar, N.S.Nipales, W.Giger, C.G.Daughton, T.Jones-Lepp, 2001. Proceedings of the Symposium series on pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Scientific and Regulatory Issues*, 791 (3): 56-69.
- [18] M.E.Lindsey, M.Meyer, E.M.Thurman, 2001. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials, in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73 (73): 4640-4646.
- [19] E.M.Golet, A.C.Alder, A.Hartmann, 2001. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in solid-phase extraction urban wastewater by and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Chemistry*, 73(15): 3632-3638.
- [20] A.Hartmann, A.C.Alder, T.Koller, 1998. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (3): 377-382.
- [21] A.Leitner, P.ZRllner, W.Lindner, 2001. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 939 (1-2): 49-58.
- [22] Commission Regulation (EC) 1442/95, Amending annexes I, II, III e IV, of Council Regulation (EEC) no 2377/90, laying down a community procedure for the establishment of

maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*, L143, 1995, 26-27.

[23] Commission Decision (EC) 2002/250, relativa à extensão das medidas de protecção previstas pela Decisão 2001/699/CE no que diz respeito aos produtos da pesca e da aquicultura importados do Vietname *Official Journal of the European Communities*, L84, 2002, 75-76.

[24] N.M.Angelini, O.D.Rampini, H.Mugica, 1997. Liquid chromatographic determination of nitrofurantoin residues in bovine muscle tissues. *Journal of AOAC International*, 80 (3): 481-485.

[25] R.J.McCracken, W.J.Blanchflower, C.Rowan, M.A.McCoy, D.G.Kennedy, 1995. Determination of furazolidone in porcine tissue using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry and a study of the pharmacokinetics and stability of its residues. *Analyst*, 120 (9): 2347-2351.

[26] C.H.G.Daughton, T.A.Ternes, 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environmental Health Perspectives*, 107 (6): 907-938.

[27] W.Gau, J Kurz, U.Petersen, H.Ploschke, C.Wuensche, 1986. Isolation and structural elucidation of urinary metabolites of ciprofloxacin. *Drug Residues*, 36 (10): 1545-1549.

[28] S.A.Brown, 1996. Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19 (1): 1-14.

[29] B.Suh, B.Lorber, 1995. Quinolones. *Medical Clinics of North America*, 79(4): 869-894.

[30] Y.Picó, V.Andreu, 2007. Fluoroquinolones in soil-risks and challenges. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 387 (4): 1287-1299.

[31] J.Beausse, 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends Analytical Chemistry*, 23 (10-11): 753-761.

[32] K.G.Karthikeyan, M.T.Meyer, 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin. *Science of the Total Environment*, 361 (1-3): 196-207.

[33] M.S.Díaz-Cruz, M.J.Lopez de Alda, D. Barceló, 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Analytical Chemistry*, 22 (6): 340-351.

[34] E.Turiel, A.Martín-Esteban, J.L.Tadeo, 2007. Molecularly imprinted polymeric fibers for solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 79 (8): 3099-3104.

[35] S.Valsecchi, 1997. Determination of anions in rainwater by capillary electrophoresis with conductivity detection. *Journal of Chromatography A*, 760 (2): 326-332.

[36] H.Sirén, 2002. Environmental water monitoring by capillary electrophoresis and result comparison with solvent chemistry techniques. *Journal of Chromatography A*, 957 (1): 17-26.

[37] E.A.Pereira, 2004. Indirect determination of chloride and sulfate ions in alcohol fuel by capillary electrophoresis. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 380 (1): 178-182.

- [38] C.S.Chang, W.H.Wang, C.E.Tsai, 2008. Simultaneous determination of eleven quinolones antibacterial residues in marine products and animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(6): 87-96.
- [39] L.Haixia, X.Wu¹, Z.Xie, X.Lin, L.Guo, C.Yan, G. Chen, 2001. Separation and determination of seven fluoroquinolones by pressurized capillary electrochromatography. *Journal of Separation Science*, 28 (16): 2210-2217.
- [40] A.C.Hueta, C.Charliera, G.Singh^b, S.Benrejeb Godefroy^b, J.Leivoc, M.Vehniäinen^c, M.W.F.Nielend, S.Weigel, 2008. Development of an optical surface plasmon resonance biosensor assay for (fluoro)quinolones in egg, fish, and poultry meat. *Analytica Chimica acta*, 623 (2): 195–203.
- [41] C.W.Jeon , M.A.Khan , S.H.Lee, M.M.Karim , H.K.Lee ,Y.S.Suh , S.M.Alam, H.Y.Chung, 2008. Optical flow-through sensor for the determination of Norfloxacin based on emission of $\text{KMnO}_4\text{-Na}_2\text{SO}_3\text{-Tb}^{3+}$ system. *Journal Fluorescence*, 18 (5): 843-851.
- [42] A.L.Kadurugamuwa, L.V.Sin, J.Yu, K.P.Francis, T.F.Purchio, P.R.Contag, 2004. Non invasive optical imaging method to evaluate postantibiotic effects on biofilm infection in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (6): 2283-2287.
- [44] X.X.Sun, X.Zhang, H.Y.Aboul-Enein, 2004. Construction and characterization of potentiometric sensor for the determination of oxytetracycline hydrochloride. *Il Farmaco*, 59 (4): 307-314.
- [45] D.Monroe, 1989. Potentiometric (Bioselective Electrodes) Assay Systems: Utility and Limitations. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 27 (2): 109-158.
- [46] O.B.Samuelsen, 2006. Pharmacokinetics of quinolones in fish: a review. *Aquaculture*, 255 (1-4): 55-75.
- [47] M.A.Bulkibash, M.S.Sultan, A.M.Al-Olyan, S.M.Al-Ghannam, 2003. Differential electrolytic potentiometric titration method for the determination of ciprofloxacin in drug formulations. *Talanta*, 61 (2): 239-244.
- [48] J.M.Calatayud, 1996. Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the laboratory. *Taylor and Francis*. London (U.K.).
- [49] Y.Deng, 1997. Determination of major inorganic anions in rainwater by capillary electrophoresis. *Water Research*, 32 (8): 2249-2256.
- [50] A.M.Lemos, A.P.Noble, H.J.Segat, I.D.Alexandre, L.Pappis, L.T.Nunes, L.V.Neves, 2009. *Espectroscopia visível e ultravioleta*. Universidade Federal de Santa Maria Centro de Ciências Naturais e Exatas, Santa Maria, RS, Brasil.
- [51] D.B.Gordon, 1995. Spectroscopic Techniques. *Principles and Techniques in Practical Biochemistry*. K. Wilson & Walker Eds., Cambridge University Press, Cambridge. 324-344.
- [52] Wolfbeis, O. S., 2008. *Anal. Chem.* 80, 4269.

- [53] B.Khezri; M.K.Amini,A.R.Firooz; 2008. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1943-1950.
- [54] P.C.A.Jeronimo, A.N. Araujo, Montenegro, 2007. *M. C. B. S. M.. Talanta*, 72, 13 – 27.
- [55] S.M.Ng, R.Narayanaswamy, 2006; *Anal. Bioanal. Chem*, 386, 1235 – 1244.
- [56] D.T.Newcombe, T.J.Cardwell, R.W.Cattrall, S.D.Kolev, 1999. *Anal. Chim. Acta* 395, 27 - 32.
- [57] J.Norris, 1989. *Analyst*, 114, 1359 - 1372.
- [58] V.K.Gupta, S.Chandra, R.Mangla, 2002. Dicyclohexano-18-crown-6 as active material in PVC matrix membrane for the fabrication of cadmium selective potentiometric sensor, *Eletrochim. Acta*,47, 1579-1586.
- [59] E.Skibsted, C.Lindemann,C.Roca, L.Olsson, 2001. *J. Biotechnol.*, 88, 47 - 57.
- [60] M.N.Taib, R.Narayanaswamy, 1995. *Analyst*, 120, 1617 - 1625.
- [61] K.M.G.Lima, I.M.Raimundo, M.F.Pimentel, A.M.S.Silva, 2009. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. *Química Nova*, 32 (6):1635-1643.
- [62] F.N.Leite, 2006. *Calibração de dispositivos a cores utilizando uma câmara digital*. Tese de Mestrado em Engenharia Elétrica. Faculdade de Tecnologia da Universidade de Brasília. p.20, 73pp.
- [63] R.C.Gonzáles, e R.E.Woods, 2002. *Digital Image Processing*. Prentice Hall, New Jersey, vol.2.
- [64] L.D.Grandis, 1986. *Theory and Use of Color*. New York: Harry N. Abrams, Inc.
- [65] J.H.Trussell, S.Eli, M.Vrhel, 2005. Color Image Processing. *Lee Signal Processing Magazine*, 14: 14-22.
- [66] C.A.B.Jan, D.T.Spyros, 2005. Color Vision. *Journal of Chemical Crystallography*, Springer Netherlands, 433-439.
- [67] A.C.Leão, A.Araújo, e L.A.C.Souza, 2005. Implementação de sistema de gerenciamento de cores para imagens digitais. *PUC-Minas*, Poços de Caldas, MG, Brazil, cap.3: 61 – 96.
- [68] R.G.Kuehni, 2004. Color: Introduction to Practice and Principles. *Wiley*, vol.2, 216pp.
- [69] P.C.Hung, 1993. Colorimetric calibration in electronic imaging devices using a look-up-table model and interpolations. *Journal Electronic Imaging*, vol. 2, pp. 53-61.
- [70] G.Wyszecki, e W.S.Stiles, 2000. Color science concepts and methods, quantitative data and formulae. *Wiley Classics Library Edition*.
- [71] F.Burriel Marti, F.Lucena Conde, S.Arribas Jimeno, J.Hernandez Mendez, 2000. Química Analítica Qualitativa. *Editorial Paraninfo*, Madrid, Espanha.
- [72] K.K.Ghosh, P.Sharma, 2005. Spectrophotometric study of the interaction of b-cyclodextrin with hydroxamic acids. *Journal of Dispersion Science and Technology*, vol. 26, pp. 723-728.
- [73] Decreto-lei 243/2001 de 05 de Setembro de 2001, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, *Aprova normas relativas à qualidade da água destinada ao*

consumo humano, transpondo para o direito interno a Directiva n.º 98/83/CE, do Conselho, de 3 de Novembro, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, Diário da República, Série A, 206, p. 5754.

