



## **Desenvolvimento de sensores colorimétricos para despiste de antibióticos**

**CARLA NATÁLIA OLIVEIRA TEIXEIRA**

Julho de 2014

# Desenvolvimento de sensores colorimétricos para despiste de antibióticos

Carla Teixeira, N° 1050158

Orientação: Dr<sup>a</sup> Goreti Sales

**Ano letivo 2013/2014**

# Mestrado em Engenharia Química: Tecnologias de Proteção Ambiental

Desenvolvimento de sensores colorimétricos para  
despiste de antibióticos

**Carla Teixeira, 1050158@isep.ipp.pt**

Departamento de Engenharia Química

Orientador: Maria Goreti Ferreira Sales



## **Agradecimentos**

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

Aos meus colegas de trabalho no BioMark, Sensor Research, nomeadamente à Liliana Truta, Helena Gomes, Felismina Moreira, Sofia Santos, Nádía Ferreira, Ana Moreira, que estiveram sempre disponível para ajudar nas dúvidas que foram surgindo e pelas opiniões dadas.

À minha família, ao meu namorado e aos meus amigos que, com muito carinho, paciência, compreensão e apoio me ajudarem a completar esta etapa da minha vida.



## Resumo

O aumento da produtividade em sistemas de aquacultura está associado com a introdução de drogas que assegurem o crescimento e a preservação das espécies, mas que eventualmente se espalham para o meio aquático envolvente, promovendo alterações da biodiversidade e entrar, directamente ou indirectamente, na cadeia alimentar. Quando estas drogas são agentes antimicrobianos de uso humano, tais como a amoxicilina, tetraciclina ou sulfonamidas, há um alto risco de aparecimento de espécies bacterianas resistentes, algo que constitui uma ameaça grave para a saúde pública.

Esta introdução de agentes antimicrobianos no ambiente aquático através do sector das pescas pode ser reduzida através da monitorização regular ou contínua dos níveis de antibióticos no sistema de água, durante a execução, bem como antes da descarga para o meio aquático. Para isso, é necessário métodos analíticos que permitam uma frequência analítica elevada e contínua, nos tanques de cultivos dos peixes.

O presente trabalho descreve para este efeito, um sensor constituído por papel quimicamente modificado por reações em monocamadas, assumindo uma coloração típica após contacto com o antibiótico. A intensidade da coloração estava relacionada com a concentração desse antibiótico.

A modificação do papel foi baseada na alteração química das unidades de glucose do papel por meio de uma reação covalente com reagentes apropriados. De seguida, criou-se uma camada de quitosano sobre o papel modificado onde se adsorveu a espécie metálica capaz de mudar de cor na presença de sulfadiazina. As modificações resultantes foram avaliadas em relação a vários parâmetros, com o intuito de provocar uma variação de cor intensa face à concentração de antibiótico.

Os sensores preparados foram caracterizados do ponto de vista do seu desempenho analítico, efetuou-se a construção de uma gama de concentração que permitiu obter uma resposta previsível e transversal em relação a outros antibióticos, bem como a identificação de uma relação linear entre concentração e coordenadas de cor e a aplicação de sensores em amostra de água ambiental dopados com antibiótico.

Generalizando, foi possível estabelecer um processo de modificação simples de papel capaz de medir a presença e quantidade de sulfadiazina

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



## Abstract

Increasing productivity in aquaculture systems is associated to the introduction of drugs that ensure the growth and preservation of species, but which eventually spread to the surrounding aquatic environment, promoting changes in biodiversity and entering, directly or indirectly, in the food chain. When these drugs are antimicrobial agents for human use such as amoxicillin, tetracycline or sulfonamides, there is a high risk of emergence of resistant bacterial species, something which constitutes a serious threat to public health.

This introduction of antimicrobial agents on the aquatic environment through the fisheries sector can be reduced by regular or continuous monitoring of the levels of antibiotics in the water system during the implementation, as well as before discharge to the water environment. For this, analytical methods allowing high analytical frequency and continues in crops of fish tanks is necessary.

The present study describes a sensor for this purpose consisting of paper chemically modified by reactions in monolayers, assuming a typical color after contact with the antibiotic. The staining intensity was related to the concentration of antibiotic

The modification of the paper was based on the chemical modification of the glucose units of the paper by covalent reaction with appropriate reagents. Then created a layer of chitosan on the modified paper where the adsorbed metal species are capable of changing color in the presence of sulfadiazine paper. The resulting changes were evaluated for various parameters so as to cause a change in color due to high concentration of antibiotic.

The sensors prepared were characterized from the point of view of its analytical performance, we performed the construction of a concentration range that allows getting a predictable response and crossover other antibiotics, as well as the identification of a linear relationship between concentration and color coordinates and the application of sensors in environmental water sample doped with antibiotic.

Generalizing, it was possible to establish a simple modification process paper able to measure the presence and quantity of sulfadiazine.

**Key words:** Water, Aquaculture, Environment, Sensor, Paper Antibiotic





## Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo .....	iii
Abstract .....	v
Abreviaturas .....	xviii
1. Introdução.....	1
1.1. Aquacultura.....	1
Compostos presentes em aquacultura .....	2
1.2. Sulfonamidas .....	3
1.2.1. Métodos analíticos para deteção de sulfonamidas .....	4
Métodos óticos.....	5
Métodos separativos.....	5
Métodos electroanalíticos .....	5
1.3. Biossensores .....	6
1.3.1. Funcionamento de um biossensor.....	7
1.3.2. Componente biológico .....	8
Biossensores enzimáticos.....	8
Biossensores microbiológicos.....	9
Imunossensores.....	9
Quimiorreceptores.....	9
1.3.3. Transdutor.....	9
Biossensores eletroquímicos .....	10
Biossensores amperimétricos .....	10
Biossensores potenciométricos .....	11
Biossensores condutimétricos .....	11
Biossensores óticos .....	12
Biossensores calorimétricos .....	12
1.3.4. Aplicação dos biossensores .....	12
1.4. Modelos de cor .....	13
2. Descrição Experimental .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b> 5
2.1. Material, equipamentos e reagentes.....	15
2.2. Reações de desenvolvimento com a sulfadiazina .....	155
2.2.1. Agentes complexante inorgânicos .....	155
2.2.2. Agentes complexante orgânico.....	166
2.3. Procedimentos de modificação do papel .....	177
2.3.1. Carboxilação da superfície.....	177



2.3.2. Adsorção de quitosano e cobre .....	177
2.3.2.1. Layer-by-layer .....	177
2.4. Verificação da formação de cor .....	19
2.5. Caracterização analítica .....	19
2.5.1. Gama de linearidade.....	19
2.5.2. Seletividade .....	20
2.5.3. Estabilidade .....	20
2.5.4. Aplicabilidade.....	20
3. Resultados e discussão.....	211
3.1. Reações de desenvolvimento com a sulfadiazina .....	211
3.1.1. Agentes complexantes inorgânicos .....	211
3.1.2. Agente complexante orgânico.....	222
3.2. Modificação química do papel.....	233
3.2.1. Carboxilação da superfície.....	244
3.2.2. Layer-by-layer .....	277
3.3. Verificação da formação de cor .....	28
3.4. Caracterização analítica .....	311
3.4.1. Gama de linearidade.....	311
3.4.2. Seletividade .....	344
3.4.3. Estabilidade .....	355
3.4.4. Aplicabilidade.....	366
4. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro .....	39
5. Bibliografia .....	400
Anexo A .....	401
Anexo B .....	407
Anexo C .....	51
Anexo D .....	61



## Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Tipo de compostos presentes na aquacultura.....	3
Tabela 1.2 - Propriedades gerais das Sulfonamidas (3) .....	4
Tabela 3.1 - Cores das soluções de agentes complexantes inorgânicos, antes e depois da adição de SDZ.....	21
Tabela 3.2 – Registo das alterações verificadas na reações com acetato de amónio, sulfato de cobre e SDZ em diferente pH.....	29
Tabela 3.3 - Coordenadas de cor das imagens do sensor em diferentes concentrações de OXI, obtidas por fotografia. ....	33
Tabela 3.4 – Coordenadas de cor das imagens dos sensores em água dopada obtidas por fotografia.....	38
Tabela D.1 – coordenadas RGB das soluções padrão e o respetivo logaritmo da concentração .....	62
Tabela D.2 – coordenadas RGB da água dopada.....	62
Tabela D.3 – Analise do erro cometido .....	63



## Índice de figuras

Figura 1.1- Sistemas de aquacultura disponíveis segundo a food and Agriculture Organization (2) .....	1
Figura 1.2 - Esquema geral de funcionamento de um biossensor. (4).....	7
Figura 1.3 - Classificação dos biossensores de acordo com o Elemento Biológico Sensível. (4).....	8
Figura 1.4 - Tonalidade, Luminosidade e Saturação (6). .....	14
Figura 2. 1 - Esquema de adição de SDZ nos diferentes ensaios.....	16
Figura 2. 1 - Esquema de adição de SDZ nos diferentes ensaios .....	16
Figura 3.1 – Espectro de absorvância de sulfato de cobre e deste com SDZ .....	22
Figura 3.2 - Espectro de absorvância de EDTA, deste com o cobre e com a SDZ .....	23
Figura 3.3 – Espectro de absorvância de acetato de amónio, deste com o cobre e com a SDZ.....	23
Figura 3.4 – Fotografia do papel antes da modificação e depois da modificação química .....	24
Figura 3.5 - Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel e do papel modificado obtido, relativos à temperatura ambiente e a 60°C nos respetivos tempos de reação.....	25
Figura 3.6 - Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel relativos à temperatura de 60 e 80°C nos respetivos tempos de reação. ....	25
Figura 3.7 - Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel relativos à temperatura de 60 ao fim de 1h (vermelho) e de 2h (rosa).....	26
Figura 3.8- Ensaio para a construção da monocamada.....	27
Figura 3.9– Resposta do sensor à adição de SDZ.....	28
Figura 3.10 - Reação de precipitação entre a SDZ e o cobre .....	29
Figura 3.11 – reação entre o precipitado e ácido sulfúrico.....	30
Figura 3.12 – Espectros da SDZ, de sulfato de cobre e do precipitado formado.....	30
Figura 3.13 – Complexo ternário de cobre (8).....	31
Figura 3.14 - Ensaio gama de linearidade para as respetivas concentrações $5 \times 10^{-3}$ , $1 \times 10^{-3}$ , $5 \times 10^{-4}$ , $1 \times 10^{-4}$ , $5 \times 10^{-5}$ , $1 \times 10^{-5}$ , $5 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-6}$ M.....	31
Figura 3.15 – Ensaio gama de linearidade para as respetivas concentrações $5 \times 10^{-3}$ , $4 \times 10^{-3}$ , $3 \times 10^{-3}$ , $2 \times 10^{-3}$ , $1 \times 10^{-3}$ , $9 \times 10^{-4}$ , $8 \times 10^{-4}$ , $7 \times 10^{-4}$ , $6 \times 10^{-4}$ , $5 \times 10^{-4}$ M.....	32
Figura 3.16 – Paleta de cor obtida para as várias concentrações.....	34
Figura 3.17 – Fotografia do ensaio de seletividade para os vários antibióticos .....	34
Figura 3.18– Paleta de cores obtidas para os vários antibióticos .....	35

Figura 3.19– Estabilidade do sensor quando armazenado à Ambiente e no frigorífico .....	35
Figura 3.20 – Resultados obtidos numa água dopada .....	36
Figura 3.21 - Resultados obtidos da gama de linearidade e os ensaios da água dopada .....	37
Figura 3.22 - Paleta de gama de linearidade com os resultados de água dopada. ....	37
Figura 3.23 - Curva de calibração .....	38
Figura A.1 – Espectro de absorvância da SDZ .....	42
Figura A.2 – Espectro de absorvância de permanganato de potássio e deste com SDZ .....	42
Figura A.3 – Espectro de absorvância de cloreto de ferro e deste com SDZ .....	43
Figura A.4 – Espectro de absorvância de nitrato de chumbo e deste com SDZ .....	43
Figura A.5 – Espectro de absorvância de sulfato de cobre e deste com SDZ .....	43
Figura A.6 – Espectro de absorvância de sulfato de alumínio e deste com SDZ .....	44
Figura A.7 – Espectro de absorvância de cloreto de magnésio e deste com SDZ .....	44
Figura A.8 – Espectro de absorvância de cloreto de zinco e deste com SDZ .....	45
Figura A.9 – Espectro de absorvância de lodo e deste com SDZ .....	45
Figura B.1 – Espectro de absorvância de acrilamida, desta com o cobre e com a SDZ .....	48
Figura B.2 – Espectro de absorvância de N-ter-butyl-acrilamida, deste com o cobre e com a SDZ .....	48
Figura B.3 – Espectro de absorvância de tris(hidroximetil)aminometano, deste com o cobre e com a SDZ .....	48
Figura B.4 – Espectro de absorvância de EDTA, deste com o cobre e com a SDZ .....	49
Figura B.5 – Espectro de absorvância de cloreto de amónio, deste com o cobre e com a SDZ .....	49
Figura B.6 – Espectro de absorvância de cloridrato de trietanolamina, desta com o cobre e com SDZ .....	50
Figura B.7 – Espectro de absorvância de acetato de amónio, deste com o cobre e com SDZ .....	50
Figura C.1 – Espectro do papel sem modificação química .....	52
Figura C.2 – Espectro do papel modificado à temperatura ambiente ao fim de 30 e 60 min .....	52
Figura C.3 – Espectro do papel modificado à temperatura ambiente ao fim de 120 e 240 min .....	53
Figura C.4 – Espectro do papel modificado à temperatura ambiente ao fim de 300 e 360 min .....	54



Figura C.5 – comparação dos espectros do papel sem modificação e do papel modificado ao fim de 24h .....	55
Figura C.6 – Espectro do papel modificado à temperatura ambiente .....	55
Figura C.7 – Espectro do papel modificado à temperatura de 40 °C ao fim de 1 e 2 h .	56
Figura C.8 – Espectro do papel modificado à temperatura de 40 °C ao fim de 3 h .....	56
Figura C.9 – Espectro do papel modificado à temperatura de 40 °C ao fim de 4 e 5 h .	57
Figura C.10 - Espectro do papel modificado à temperatura de 40 °C .....	57
Figura C.11 – Espectro do papel modificado à temperatura de 60 °C ao fim de 1, 2 e 3h .....	58
Figura C.12 – Espectro do papel modificado à temperatura de 80 °C ao fim de 1, 2h ..	59
Figura C.13 – Espectro do papel modificado à temperatura de 80 °C ao fim de 3h .....	60
Figura C.14 – Espectro do papel modificado à temperatura de 80 °C .....	60
Figura D.1 – curva de calibração.....	62





### **Abreviaturas**

EDTA - etilenodiamina

SDZ – sulfadiazina

STZ – sulfatiazol

SMZ – sulfametoxazol

Tec - tetraciclina

Difl - difloxacina



## 1. Introdução

**1.1. Aquacultura** O crescimento da população humana e as alterações dos seus hábitos alimentares originou um aumento regular do consumo de peixe, conduzindo à diminuição das populações selvagens de pescado, surgindo assim a necessidade de encontrar medidas económicas e ambientais viáveis (1). A aquacultura, surge neste contexto e assume cada vez mais um papel socioeconómico importante, visando assegurar o aumento da produção de peixe através de práticas como a alimentação artificial, a proteção contra predadores, integração com outras espécies ou controlo populacional e a manutenção de espécies em risco de extinção. (2)

Aquacultura é a produção em cativeiro de animais, como peixes, moluscos, crustáceos, batráquios ou plantas que tenham um *habitat* predominantemente aquático, em pelo menos uma fase da sua vida (1). As principais áreas de aquacultura são classificadas segundo o tipo de organismos produzidos (crustáceos; algas; moluscos; ou peixes), ou consoante ambiente de cultura (marinho; água doce; ou salobra), ou conforme a temperatura (água temperada ou água fria).



**Figura 1.1-** Sistemas de aquacultura disponíveis segundo a Food and Agriculture Organization (2)

Aquacultura oferece vantagens sociais às populações de inúmeros países onde o pescado marinho não pode chegar em boas condições sanitárias e a preços razoáveis. Contudo, também tem problemas, como o caso de países como Reino Unido, Canadá e Noruega, onde o cultivo de salmão e de truta são as formas de aquacultura de crescimento mais rápido, mas à medida que este tipo de exploração expande-se a qualidade dos peixes selvagens é afetada, particularmente do salmão. (2)

Os efluentes da aquacultura intensiva ou industrial podem prejudicar o ecossistema se lançados no meio ambiente sem o devido tratamento, devido às rações e outros produtos que usam para maximizar a produção.

Um outro problema da aquacultura é o potencial para aumentar a disseminação de espécies invasivas, visto que frequentemente as espécies criadas não são nativas das áreas de cultivo. Quando há fugas do criadouro para o meio ambiente é frequente que os animais introduzidos se revelem mais resistentes que as espécies nativas e praticamente tomam de assalto os ecossistemas. Outro problema potencial é a disseminação de parasitas e pragas introduzidas. (1)

### **Compostos presentes em aquacultura**

Anteriormente, foi mencionado que na aquacultura eram utilizados uma larga gama de compostos químicos, como antibióticos, parasiticidas, fertilizantes, anestésicos, hormonas, oxidantes e algicidas /herbicidas. Os riscos associados à utilização destes compostos encontram-se indicados na tabela 1.1. (2). Eles dependem essencialmente do grupo em que se inserem e da forma ou dose com que o composto em causa é introduzido no sistema. De uma forma geral, são os antibióticos que têm despertado uma maior preocupação no domínio da segurança pública.

**Tabela 1.1** - Tipo de compostos presentes na aquacultura

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

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

Dos vários grupos de antibióticos associados a episódios de resistência microbiana encontram-se as sulfonamidas, mais precisamente a sulfadiazina.

### 1.2. Sulfonamidas

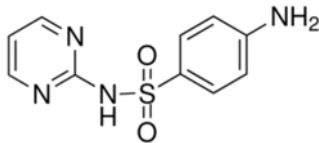
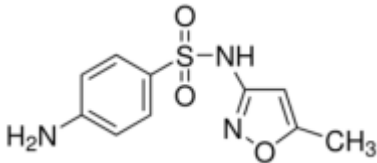
As sulfonamidas representam um grupo de antibióticos que contêm um núcleo comum de sulfanilamida. Este núcleo é constituído por um grupo arilo com uma amina e um grupo sulfonamida em posição *para*. As diversas sulfamidas são distinguidas

através da substituição neste último grupo, podendo descrever-se cerca de 30 estruturas diferentes.(3)

Quando em contato com as bactérias, as sulfonamidas competem com o ácido *p*-aminobenzóico para a síntese do ácido fólico, devido à semelhança estrutural, impedindo deste modo a síntese de DNA e a subsequente divisão celular. Por este motivo as sulfonamidas apresentam uma ação bacteriostática, exercida sobretudo em bactérias *gram*-positivas e negativas e em alguns protozoários. (3)

Na tabela 1.2 estão representadas as propriedades gerais das sulfonamidas

**Tabela 1. 2** - Propriedades gerais das Sulfonamidas (3)

<b>Sulfadiazina</b>	<i>Estrutura Química</i>	
	<i>Nomenclatura</i>	4-Amino- <i>N</i> -(2-pirimidinil)benzenosulfonamida
	<i>Fórmula</i>	C10H10N4O2S
	<i>Peso molecular</i>	250,3 g/mol
<b>Sulfametoxazole</b>	<i>Estrutura Química</i>	
	<i>Nomenclatura</i>	4-Amino- <i>N</i> -(5-metil-3-isoxazolil) benzenosulfonamida
	<i>Fórmula</i>	C10H11N3O3S
	<i>Peso molecular</i>	253,3 g/mol

### 1.2.1. Métodos analíticos para deteção de sulfonamidas

Ao longo deste trabalho, verificou-se a existência de pouca informação no que diz respeito a métodos de determinação de sulfonamidas em meio aquático. O que levou a que se incluísse todos os métodos dedicados a determinação de sulfonamidas em produtos farmacêuticos, amostras alimentares e bebidas, publicados nestes últimos anos. (3)

As técnicas analíticas utilizadas no controlo de tetraciclinas podem ser e natureza, separativa, electroanalítica e ótica. Refere-se de seguida uma descrição breve dos

métodos instrumentais, no sentido de se poder estabelecer uma base comparativa para as suas principais vantagens e desvantagens.

### **Métodos óticos**

Os métodos óticos recorrem à interação da radiação eletromagnética com a matéria, em toda a gama do espectro, desde os raios X até aos microondas, por esta razão são, baseados em fenómenos de ótica clássica. De um modo geral, classificam-se de acordo com a natureza da interação em curso, nomeadamente absorção, emissão, difração, refração, dispersão, reflexão e polarização.(3)

Alguns dos métodos óticos para a quantificação de sulfonamidas, baseiam-se em medidas por espectrofotometria de absorção atómica, por espectrofotometria de absorção UV/VIS ou por quimioluminescência, a aplicação destes métodos é usada principalmente na análise de produtos farmacêuticos fluidos biológicos, leite e cerveja. Alguns dos métodos apresentados são efectuados em condições de fluxo, associados a sistemas FIA (3)

### **Métodos separativos**

Os métodos instrumentais separativos pressupõem uma separação dos constituintes de interesse na amostra, antes de se efetuar a medida analítica. Na literatura são descritos diversos trabalhos que recorrem ao uso de técnicas separativas para a determinação de sulfonamidas, de natureza cromatográfica ou electroforética na maioria dos casos em amostras alimentares e fluidos biológicos, como mostra as tabelas seguintes. Nesta fase, já se começa a assistir a uma aplicação destas técnicas a amostras de ambientais, sejam elas águas, solos efluentes ou mesmo produtos resultantes do tratamento das águas como é o caso das lamas.(3)

Apesar de todas as vantagens que lhe são inerentes, as metodologias cromatográficas ou electroforéticas poderão não ser as mais adequadas ao controlo de rotina, pela impossibilidade de realização de análises expeditas, a baixo custo e com baixo impacto ambiental. Em alternativa a estas, encontram-se também descritos na literatura, os métodos electroanalíticos.(3)

### **Métodos electroanalíticos**

Os métodos electroanalíticos fornecem informação química sobre a solução em estudo, através da medida de uma propriedade de natureza eléctrica numa célula electroquímica. Relativamente aos métodos instrumentais anteriores estes oferecem

algumas vantagens, permitem obter informação rápida de natureza quantitativa para quantidades vestigiais de analito; utilizam equipamento de baixo custo e de fácil miniaturização o que aumenta a portabilidade, com possibilidade de efetuar análises de campo; podem fornecer informação sobre a estequiometria e constantes de equilíbrio dos compostos em estudo, e recorrem a processos de preparação de amostra pouco sofisticados e mais amigos do ambiente.(3)

Os métodos electroanalíticos mais utilizados para a determinação de sulfonamidas aplicam-se a produtos farmacêuticos ou leite, recorrendo a técnicas voltamétricas e amperimétricas. A voltametria mede a corrente eléctrica produzida num sistema de três eléctrodos, através de uma variação contínua de potencial, enquanto a amperimétrica mede a corrente eléctrica produzida, a um potencial constante. (3)

### 1.3. Biossensores

Na literatura, encontram-se varias definições para biossensores, pois é uma área multidisciplinar, com uma grande diversidade e de rápida proliferação. Mas de um ponto de vista geral, os biossensores são uma ferramenta analítica que combinam biomoléculas imobilizadas com transdutores químicos ou físicos para criar uma superfície que permita a medição direta, possivelmente contínua, de um analito específico. O biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo para o analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal biológico em um sinal eléctrico proporcional à concentração do analito.(4)

Um biossensor não é um sistema bioanalítico, pois não necessita a adição de reagentes e o componente biológico está ligado diretamente ao detetor.

As informações analíticas quantitativas são fornecidas pelos biossensores usando um elemento biológico reconhecedor incorporado a um transdutor que deve ser capaz de converter a resposta química em um sinal apropriado. O elemento importante do biossensor é a camada sensora, constituída por biomoléculas, que possibilita avaliar a concentração do componente desejado contido na amostra. A seleção do material biológico e do transdutor apropriado depende de cada amostra e do tipo de medida em que se tem interesse. O biocomponente determina o grau de seletividade ou especificidade do biossensor. O reconhecimento seletivo é a principal característica da tecnologia dos biossensores. (4)

Apesar de se utilizar diferentes materiais e transdutores na construção dos biossensores os eletroquímicos são os mais populares, apresentam uma resposta rápida, possuem a vantagem de serem económicos e a possibilidade de automação, permitindo sua aplicação em um grande número de amostras. (4)

O desenvolvimento dos biossensores é definido pela natureza da aplicação, pelas exigências regulatórias e alguns fatores desempenham um papel decisivo na arquitetura do sensor como sensibilidade, meio ambiente de amostra, custo, tempo de vida útil e uso específico.

O biossensor para ser usado como instrumento de análise deve de apresentar características específicas como:

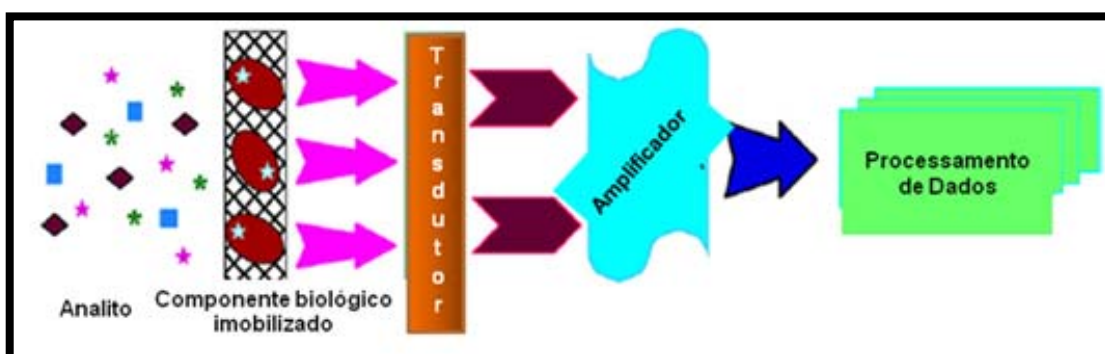
- ✓ Seletividade, exemplificada pela especificidade das enzimas;
- ✓ Faixa de sensibilidade; acurácia e precisão;
- ✓ Tempo de resposta e de recuperação;
- ✓ Frequência de amostragem;
- ✓ Estabilidade operacional e reprodutibilidade dos resultados, entre outros.

### 1.3.1. Funcionamento de um biossensor

Segundo as divisões da química analítica e físico-química da IUPAC um biossensor é um dispositivo que é capaz de fornecer informação analítica "específica", quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) o qual está em contato espacial direto com um elemento de transdução.

Um biossensor é formado de duas partes: o componente biológico e o transdutor. O componente biológico faz o reconhecimento da substância de interesse por meio de uma reação química gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, libertação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, etc. O transdutor converte este sinal numa resposta mensurável tal como: corrente, potencial, variação de temperatura. (4)

Generalizando, o funcionamento de um biossensor engloba a especificidade e alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse. Como produto desta interação entre a molécula biológica e o substrato ocorrem variações de um ou mais parâmetros físico-químicos que são convertidos num sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado, como mostra a figura seguinte.



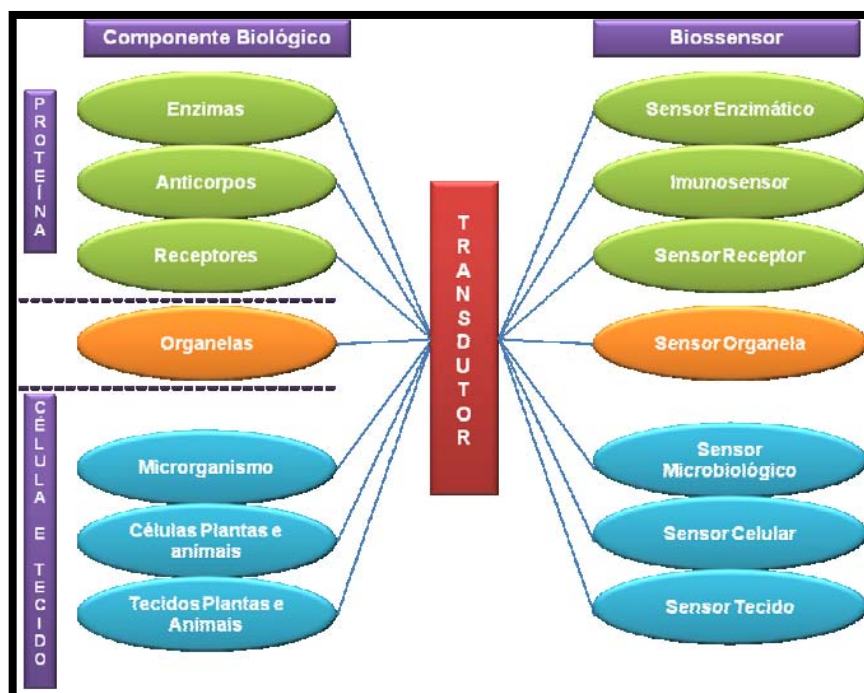
**Figura 1.2** - Esquema geral de funcionamento de um biossensor. (4)

### 1.3.2. Componente biológico

Uma das características mais importantes do biossensor é a seletividade, esta função é principalmente do componente biológico, embora algumas vezes o transdutor também contribua para a seletividade. Por esta razão as enzimas foram e continuam sendo o elemento biológico mais usado na construção de biossensores. (4)

O biocomposto para atuar como elemento de reconhecimento biológico tem que obedecer a alguns requisitos básicos, como disponibilidade de um sítio reativo que possa reagir ou interagir com o analito, estabilidade face ao meio e as condições de medição e possibilidade de modificação ou imobilização sobre suporte por método químicos sem afetar o seu desempenho.

Tendo em atenção a sensibilidade do biocomposto utilizado para a sua construção os biossensores podem ser divididos em várias classes como mostra a figura 1.3, mas as classes dos biossensores enzimáticos, microbiológicos, os quimiorreceptores e os imunossensores são as mais desenvolvidas.



**Figura 1.3** - Classificação dos biossensores de acordo com o Elemento Biológico Sensível. (4)

#### Biossensores enzimáticos

Estes biossensores utilizam enzimas imobilizadas como componente biológico. Tendo como vantagem, o facto de as enzimas serem catalisadores biológicos altamente específicos e seletivos. Comparados com os catalisadores químicos, as enzimas apresentam um alto nível de especificidade com o substrato,

devido á ligação forte na molécula de substrato pelo seu sítio ativo envolvendo fatores do meio ambiente reacional tais como, tamanho da molécula substrato, polaridade, grupos funcionais ligados e relativa energia de ligação.(4)

A desvantagem em relação ao uso de enzimas na construção de um biossensor é o fato de apresentar uma estabilidade relativamente baixa, sobretudo no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional, mas que podem ser contornados usando as condições adequada de pH, temperatura e pressão que garantam a manutenção da atividade enzimática. (4)

### **Biossensores microbiológicos**

Os biossensores microbiológicos são formados por um microrganismo imobilizado, sensível e reconhece especificamente a espécie de interesse, interligada a um sistema de transdução adequado. O seu princípio de funcionamento consiste na assimilação do composto orgânico pelo microrganismo, acompanhado por uma variação na atividade respiratória ou na produção de metabolitos, que são monitorados diretamente por um transdutor. (4)

### **Imunossensores**

Os imunossensores utilizam proteínas globulares de soro, como as imunoglobulinas. Os anticorpos ligam-se aos antígenos com alta especificidade e alta afinidade. Estes biossensores apresentam como principal problema o elevado peso molecular dos anticorpos que dificulta a sua adaptação ao transdutor. (4)

### **Quimiorreceptores**

Os quimiorreceptores utilizam as proteínas que interagem com espécies químicas, tais como hormônios, resultando em variações conformacionais. Manifestam problemas de ligação ao transdutor, dificuldade de manipulação e um tempo de vida curto. (4)

#### **1.3.3. Transdutor**

A seleção do transdutor é efetuada segundo três requisitos básicos, que ele seja adequado para adaptação ao material biológico imobilizado, seja altamente específico para o analito de interesse, sendo capaz de detectar alguma variação específica que ocorra durante a reação biológica e que esta variação ocorra na faixa de concentração apropriada.

Os transdutores mais utilizados são os eletroquímicos, óticos e calorimétricos. Na tabela seguinte encontram-se os vários sistemas de transdução, seus modos de medição e aplicação típica. (4)

Os biossensores também podem ser classificados de acordo com o sistema de transdução, assim pode classifica-los em eletroquímicos (Amperimétricos, Potenciométrico e Condutimétrico), Calorimétricos ou Óticos.

### **Biossensores eletroquímicos**

Estes biossensores caracterizam-se por serem, simples, sensíveis, confiáveis, de resposta rápida, requerem de instrumentação de baixo custo, operam em condições quando não é necessário um pré-tratamento da amostra e permitem efetuar determinações em uma ampla faixa de concentração. (4)

Este tipo de biossensores devido às técnicas electrostáticas fornecem limites de deteção baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem electroquimicamente determinados sistemas, sempre baseado nas propriedades elétricas de uma solução de analito quando ele esta em contato com uma célula eletroquímica. Estas informações abrangem a estequiometria e a velocidade de transferência de carga interfacial, a velocidade de transferência de massa, a extensão de adsorção e de quimiossorção e as velocidades e constantes de equilíbrio de reações químicas.(4)

Apresentam como vantagem o fato de as células eletroquímicas serem frequentemente específicas para um estado de oxidação particular e sua instrumentação é relativamente barata. Por estes motivos os biossensores eletroquímicos são os que constituem a grande maioria dos biossensores desenvolvidos. (4)

Tendo em atenção ao princípio de medição os biossensores podem ser classificados em amperimétricos, potenciométricos e condutimétricos. (4)

### **Biossensores amperimétricos**

Os biossensores amperimétricos têm como o princípio de funcionamento a medição da corrente produzida por uma reação química entre espécies eletroativas. Esta reação química ocorre num determinado potencial e a corrente gerada está relacionada com a espécie em solução. Portanto estes biossensores dependem de um sistema biológico que converta cataliticamente analitos electroquimicamente inativos em produtos que possam ser oxidados ou reduzidos num elétrodo funcional, o qual é

mantido num potencial específico de acordo com um eletrodos de referência. A corrente produzida pela reação redox é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, a qual é proporcional ao analito (substrato da enzima) não eletroativo. (4)

A desvantagem destes biossensores é a pequena faixa dinâmica devido à cinética de saturação da enzima, os potenciais relativamente elevados podem oxidar espécies diferentes do composto de interesse, a corrente pode ser afetada pela velocidade com a qual o analito difunde até a superfície do eletrodo.

Como os eletrodos quimicamente modificados são construídos através do desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas e dos medidores, surgiu uma nova classe de transdutores amperimétricos. Os mediadores podem ser incorporados aos eletrodos por adsorção, oclusão em filmes poliméricos, ligação covalente ou simplesmente misturadas em pasta de carbono. (4)

### **Biossensores potenciométricos**

Os biossensores potenciométricos utilizam um eletrodo de referência, inerte e um eletrodo operante, ambos em contato com a amostra. Estes biossensores baseiam-se no desenvolvimento de um potencial significativo no eletrodos funcional devido à acumulação da carga, ocorrendo um aumento da densidade da carga na superfície do eletrólito. Assim, as enzimas consomem ou produzem espécies químicas polares ou iões em resultância da catálise, e estas espécies são detetadas pelo eletrodo de iões seletivos e são transformadas em um sinal possível de ser lido e determinado. (4)

Estes eletrodos apresentam as vantagens de serem rápidos, sensíveis, de baixo custo e apresentarem simplicidade na medição, onde somente a medição do pH é necessária, não um sistema polarográfico como requer os sensores amperimétricos.

### **Biossensores condutimétricos**

Este tipo de biossensores baseia-se na medição da condutância e estão relacionados com o uso de enzimas que produzem ou consomem espécies iónicas, nas reações por elas catalisadas, alterando a condutividade global da solução. (4)

Asneiras das reações enzimáticas produzem uma variação da condutividade, contudo são poucas as que oferecem um sinal de magnitude estável.

Os biossensores enzimáticos contem um par de microelctrodos separados por uma solução de eletrólito incluindo a enzima e a amostra a ser detetada, é gerado pelas aplicações de uma voltagem um campo eléctrico nos microelétricos onde ocorrem variações das concentrações e de espécies polarizadas. (4)

## Biossensores óticos

Os métodos óticos de transdução são muito usados em análises bioquímicas para quantificação de determinadas substâncias graças à sua confiabilidade e grande variedade. Os métodos como fluorescência, fosforescência, absorção, polarização e interferência podem ser utilizados em sensores de estado solido. (4)

Os biossensores óticos tem com o principio de funcionamento as reações enzimáticas que alteram a propriedade óptica de determinadas substancias e a luz emitida por este elemento biológico ou a sua resposta à iluminação é transmitida através de fibra ótica e monitorada num equipamento ótico. (4)

## Biossensores calorimétricos

Os biossensores calorimétricos permitem quantificar calorimetricamente a libertação de energia que ocorre em algumas reações biológicas, relacionando a evolução de calor gerado com a quantidade de substrato reagido ou produto formado. Contudo apresentam algumas desvantagens como altos custos, serem altamente complexos e terem baixa especificidade na análise, pois toda variação de entalpia ocorrida seja na reação de mistura ou pelo efeito da diluição e solvatação ou mesmo perda de calor para o exterior, contribui para o resultado final ocasionando possíveis erros de análise. (4)

### 1.3.4. Aplicação dos biossensores

O uso de biossensores na indústria tem aumentado principalmente nas indústrias químicas e os sectores interdependentes como a indústria farmacêutica e alimentícia.

As áreas como a medicina, ambiental, alimentícia e biotecnologia tem aumentado o seu interesse por estes sensores devido à capacidade de determinar de forma seletiva analitos em amostras complexas, apresentam rapidez de análise, diminuir os custos e resíduos gerados por análise. (4)

Estes biossensores também têm a vantagem de não requererem a preparação da amostra, de longo tempo de processamento e de terem equipamentos caros como o caso do HPLC ou espectroscopia de massa.

Na área da saúde uma aplicação importante do biossensores é o controlo de glicose em pacientes com diabetes e mais recentemente no controlo do colesterol, já na área da biotecnologia os biossensores têm sido utilizados na deteção de vários nutrientes presentes nos meios de cultivo de bactérias, leveduras e fungos filamentosos e na indústria alimentícia e fermentativa de levedura de pão, de cerveja e vinho. (4)

Os biossensores também são usados na área ambiental na monitoração e controlo de ambiente, como na deteção de metais pesados em amostras de solo, ou de herbicidas e pesticidas em água dos rios e lagoas. Nos últimos anos têm sido utilizados como dispositivos analíticos com capacidades de resposta em tempo real, na deteção e monitoração de agentes químicos e biológicos perigosos. (4)

De todos os biossensores utilizados nas diferentes áreas os biossensores enzimáticos eletroquímicos são os predominantes.

#### 1.4. Modelo de cor

Um modelo de cor tem como propósito facilitar a especificação de cores padrão, generalizando um modelo de cor é uma especificação de um sistema de coordenadas 3D e um subespaço dentro desse sistema onde cada cor é representada por um único ponto.

Existem vários modelos de cores, alguns modelos conseguem representar mais cores do que os outros, por exemplo o RGB (sistema de cores formado pelo Red, Green e Blue), o CMYK (sistema de cores formado por Cyan, Magenta), o HSB (hue, saturation and brightness ou matiz, saturação e brilho), Yellow e Preto ("Key" do inglês=chave, pois é a base)), o HSL (hue, saturation, and lightness ou matiz, saturação e luminosidade) e o CIE-Lab.(5)

Em varios modelos estabelecidos as coordenadas são comuns, o brilho ou luminosidade é a quantidade de luz e pode ser detetado por variações na sua intensidade, a tonalidade, a cor propriamente dita, constituindo o próprio nome da cor, a saturação corresponde ao grau de intensidade ou croma, e relaciona-se com a pureza ou a opacidade da cor. (5)

Contudo, quando se recorre a um sistema para determinar os componentes do modelo de cor, cria-se o seu espaço de cor, aqui cada ponto representa uma cor diferente, devido a esta necessidade o comité da CIE (Comissão Internacional de Iluminação) 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), são modelos semelhantes e têm como aplicação definir as cores nos programas gráficos de computadores e combinar com a perceção das cores pelo sistema visual humano, utilizando os três eixos indicados na figura 1.4 para definir a cor.coordenadas.

A Microsoft tem disponível um programa o "Painte" que permite o tratamento de imagens baseado no modelo HSL. A caixa de diálogo de cores oferece controlos para especificar valores HSL, os valores de saturação e luminosidade deve estar no intervalo de 0 a 240, e o valor de tonalidade deve estar na faixa de 0 a 239. Na figura x



podemos observar as escalas de valores que o operador de imagem pode especificar com esses controlos.

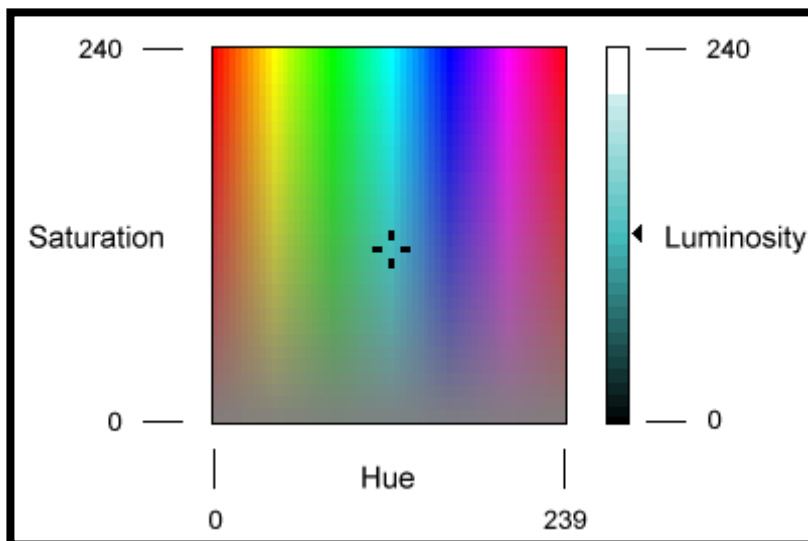


Figura 1.4 - Tonalidade, Luminosidade e Saturação (6).

## 2. Descrição Experimental

### 2.1. Material, equipamentos e reagentes

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

As pesagens dos reagentes sólidos foram efetuadas na balança analítica Radwag XA 110/X com uma precisão de  $\pm 0,0001$  g. Para acelerar a dissolução dos sólidos utilizou-se o banho ultra-sons Bandelin Sonorex Digitec. O espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220 foi utilizado para efetuar a leitura das absorvâncias das soluções preparadas. Para determinar os compostos orgânicos foi utilizado o espectrómetro de Infravermelho com transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) da Thermo Scientific Nicolet iS10.

Os reagentes utilizados foram os seguintes, todos de qualidade analítica reconhecida: cloreto de ferro hexahidratado (Scharlau), nitrato de chumbo (II) anidro (Riedel deHaen), sulfato de cobre (II) pentahidratado (Panreac), cloreto de zinco (Merck), cloreto de magnésio hexahidratado (Analar normapur), sulfato de alumínio 16-hidratado (BDH), cloreto de amónio (Analar normapur), acetato de amónio (Analar normapur), acrilamida (Sigma), N-ter-butil-acrilamida, tris(hidroximetil)aminometano (Fisher Bioreagents), cloridrato de trietanolamina (Fulka), Iodo (Riedel deHaen), metaperiodato de sódio (VWR), glutraldeído (Fulka), tetraciclina (Applichem), sulfadiazina (Sigma), sulfatiazol (Sigma), sulfametoxazol (Sigma), difloxacina (Solvay). O papel de celulose utilizado foi produzido pela Fanoia.

As cores obtidas nas superfícies de papel modificado foram registadas em máquina fotográfica digital Nikon.

### 2.2. Reações de desenvolvimento com a sulfadiazina

#### 2.2.1. Agentes complexante inorgânicos

A primeira parte do trabalho prático centrou-se na identificação das espécies metálicas capazes de formar complexos corados com a sulfadiazina.

Os agentes complexantes em estudo foram permanganato de potássio, cloreto de ferro, nitrato de chumbo II, sulfato de cobre II, sulfato de alumínio, cloreto de magnésio, cloreto de zinco e iodo.

Para este efeito, preparou-se 50 ml de uma solução de sulfadiazina  $10^{-4}$  M e 20ml dos agentes complexantes em estudo com uma concentração de  $10^{-3}$  M. De seguida, num tubo de ensaio adicionou-se 2ml da solução de agente complexante sucessivo de

2ml da solução de sulfadiazina. Por fim, traçou-se o espectro de absorção na gama de 360 a 780nm das três soluções preparadas.

### 2.2.2. Agentes complexante orgânico

#### 1º Fase

Nesta secção procedeu-se à escolha do agente complexante orgânico que irá ajudar a fixar o  $\text{Cu}^{2+}$  ao papel quimicamente modificado.

Os agentes complexantes em estudo foram EDTA (etilenodiamina), amoníaco, acetato de amónio, acrilamida, N-ter-butil-acrilamida, tris(hidroximetil)aminometano, cloridrato de trietanolamina.

Para esse fim, preparou-se 10 ml de uma solução de sulfato de cobre  $10^{-3}$  M e 10ml dos agentes complexantes em estudo.com uma concentração de  $10^{-2}$ M. De seguida, num tubo de ensaio adicionou-se 2ml da solução de sulfato de cobre sucessivo de 2ml da solução de agente complexante, traça-se o espectro de absorção na gama de 360 a 780nm das soluções preparadas. De seguida, noutro tubo de ensaio, adiciona-se 2ml da solução de sulfato de cobre sucessivo de 2ml da solução de agente complexante e por fim 2ml da solução de sulfadiazina e traça-se o espectro de absorção.

#### 2ª Fase

Com o intuito de escolher o melhor agente complexante, fixou-se todos os parâmetros e variou-se a concentração da sulfadiazina.

Preparou-se 50 ml de uma solução de sulfato de cobre  $10^{-3}$  M pH entre 4 a 5 e 10ml dos agentes complexantes em estudo.com uma concentração de  $10^{-2}$ M e uma solução de sulfadiazina  $10^{-2}$ M

De seguida, em tubos de ensaio adicionou-se 2ml da solução de sulfato de cobre sucessivo de 2ml da solução de agente complexante, e por fim sulfadiazina em diferentes concentrações como mostra o esquema abaixo. De seguida traça-se o espectro de absorção e regista-se as alterações verificadas.

SDZ				
H <sub>2</sub> O				
A.com 2ml				
Cu 2ml				
V(SDZ)	0,5	1	1,5	2
V(H <sub>2</sub> O)	1,5	1	0,5	0
Cfinal	0,0083	0,0067	0,025	0,033

**Figura 2. 1** - Esquema de adição de SDZ nos diferentes ensaios

### 2.3. Procedimentos de modificação do papel

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

Em todos os ensaios as amostras de papel de celulose tinham as mesmas dimensões (1 cm x 1 cm). O tempo de reação entre o papel de celulose e os agentes de modificação foi estabelecido após consulta de vários trabalhos descritos na literatura, onde estes agentes eram utilizados enquanto modificadores de superfícies de outra natureza

Esta fase do trabalho foi dividida nas etapas seguintes:

#### 2.3.1. Carboxilação da superfície

Para esta fase efetuou-se vários ensaios variando a temperatura e o tempo. Inicialmente cortou-se o papel em quadrados e lavou-se com água destilada. De seguida preparou-se uma solução de metaperiodato de sódio (dissolver 4,31g de periodato de sódio em 100ml de água, acertar o pH para 4,37). De seguida colocar os papeis lavados num frasco escuro com a solução preparada à temperatura ambiente sob agitação durante 30min, 1, 2, 3, 4,5,6 e 24h depois. Repetiu-se os ensaios para a temperatura de 40, 60 e 80°C

#### 2.3.2. Adsorção de quitosano e cobre

Nesta fase estudou-se a melhor forma de adsorver o quitosano e o cobre ao papel quimicamente, por layer-by-layer ou por solução de quitosano com glutaraldeído.

##### **Solução de quitosano (7)**

Pesar 1g de quitosano em pó e dissolver em 100 ml de ácido acético 2% w/w sob agitação de 200 rpm a uma temperatura de 70°C.

##### **Solução de glutaraldeído (7)**

Medir 10 ml de glutaraldeído 25% para um balão de 100ml, tamponar com fosfato 0,1 mol/l a pH 7

##### 2.3.2.1. Layer-by-layer

Nesta etapa realizou-se vários ensaio para determinar a melhor forma de adsorver o quitosano e o cobre por camadas.

### **Quitosano e glutaraldeído**

Depois de modificado o papel adicionou-se uma gota de quitosano sobre o papel, ao fim de 30 minutos adicionou-se uma gota de glutaraldeído e levou-se à estufa a uma temperatura de 50°C até secar. De seguida mergulha-se os papéis numa solução aquosa de sulfato de cobre II  $10^{-1}$ M, a mistura foi agitada durante 24h à temperatura ambiente num recipiente escuro fechado, ao fim dessas 24 horas são retirados da solução e lavados com água destilada e secos a uma temperatura máxima de 30°C.(7) Por fim colocar sobre cada papel uma gota de SDZ a diferentes concentrações.

### **Glutaraldeído e quitosano**

Depois de modificado o papel adiciona-se uma gota de glutaraldeído sobre o papel, ao fim de 30 minutos adiciona-se uma gota de quitosano e leva-se à estufa a uma temperatura de 50°C até secar. De seguida mergulha-se os papéis numa solução aquosa de sulfato de cobre II  $10^{-1}$ M, a mistura foi agitada durante 24h à temperatura ambiente num recipiente escuro fechado, ao fim dessas 24 horas são retirados da solução e lavados com água destilada e secos a uma temperatura máxima de 30°C. Por fim colocar sobre cada papel uma gota de SDZ a diferentes concentrações.

### **Quitosano**

Depois de modificado o papel adiciona-se uma gota de quitosano sobre o papel leva-se à estufa a uma temperatura de 50°C até secar. De seguida mergulha-se os papéis numa solução aquosa de sulfato de cobre II  $10^{-1}$ M, a mistura foi agitada durante 24h à temperatura ambiente num recipiente escuro fechado, ao fim dessas 24 horas são retirados da solução e lavados com água destilada e secos a uma temperatura máxima de 30°C. Por fim colocar sobre cada papel uma gota de SDZ a diferentes concentrações.

### **solução de quitosano com glutaraldeído**

Adicionou-se 2ml de quitosano com 2ml glutaraldeído. De seguida colocou-se uma gota da solução preparada sobre o papel modificado e leva-se à estufa a uma temperatura de 50°C até secar. De seguida mergulha-se os papéis numa solução aquosa de sulfato de cobre II  $10^{-1}$ M, a mistura foi agitada durante 24h à temperatura ambiente num recipiente escuro fechado, ao fim dessas 24 horas são retirados da solução e lavados com água destilada e secos a uma temperatura máxima de 30°C. Por fim colocar sobre cada papel uma gota de SDZ a diferentes concentrações.

## 2.4. Verificação da formação de cor

Devido aos resultados obtidos na fase de carboxilação da superfície, foi necessário verificar se a cor rosa que se obtinha era da reação entre o sulfato de cobre, acetato de amónio e a SDZ ou somente entre o cobre e a SDZ.

Num tubo de ensaio adicionou-se 2ml de sulfato de cobre  $10^{-2}$ M seguido de acetato de amónio com o dobro da concentração de sulfato de cobre, passado 30min adiciona-se 2ml de SDZ com uma concentração de  $10^{-3}$ M, verifica-se o pH e regista-se os resultados, a parte desta solução adiciona-se ácido clorídrico, regista-se o pH e os resultados obtidos, à restante solução adiciona-se hidróxido de sódio, regista-se o pH e os resultados obtidos.

Seguidamente num tubo de ensaio adicionou-se acetato de amónio com o dobro da concentração de sulfato de cobre seguido de 2ml de sulfato de cobre  $10^{-2}$ M, passado 30min adiciona-se 2ml de SDZ com uma concentração de  $10^{-3}$ M, verifica-se o pH e regista-se os resultados, a parte desta solução adiciona-se ácido clorídrico, regista-se o pH e os resultados obtidos, à restante solução adiciona-se hidróxido de sódio, regista-se o pH e os resultados obtidos.

Por fim num tubo de ensaio adicionou-se 2ml de sulfato de cobre  $10^{-2}$ M seguido de 2ml de SDZ com uma concentração de  $10^{-3}$ M, verifica-se o pH e regista-se os resultados, a parte desta solução adiciona-se ácido clorídrico, regista-se o pH e os resultados obtidos, à restante solução adiciona-se hidróxido de sódio, regista-se o pH e os resultados obtidos. Noutro tubo de ensaio adicionou-se acetato de amónio com o dobro da concentração de sulfato de cobre seguido de 2ml de SDZ com uma concentração de  $10^{-3}$ M, verifica-se o pH e regista-se os resultados, a parte desta solução adiciona-se ácido clorídrico, regista-se o pH e os resultados obtidos, à restante solução adiciona-se hidróxido de sódio, regista-se o pH e os resultados obtidos.

## 2.5. Caracterização analítica

Neste módulo estudou-se qual a gama de linearidade, ou seja a concentração mínima de deteção e a concentração máxima de deteção, a seletividade do sensor, a estabilidade do mesmo e a aplicabilidade.

### 2.5.1. Gama de linearidade

A gama de linearidade foi estudada para seguintes concentrações,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  M.

Em cada tubo de ensaio foi colocado um sensor seguido de 2ml de SDZ com as respetivas concentrações em estudo, e regista-se as alterações verificadas.



### 2.5.2. Seletividade

A seletividade da resposta do papel modificado face à sulfadiazina foi testada relativamente a vários antibióticos que podem ser encontrados em sistemas de aquacultura. Os antibióticos selecionados foram, sulfatiazol, sulfametoxazol, tetraciclina e difloxacina para uma concentração de  $10^{-3}$ M.

Para avaliação do efeito interferente deste antibioticos colocou-se em cada tubo de ensaio um sensor seguido de 2ml do antibiótico em estudo, e regista-se as alterações verificadas.

### 2.5.3. Estabilidade

Estudou-se a estabilidade do sensor quando armazenado à temperatura ambiente durante um período de 15 dias e quando armazenado em água destilada no frigorífico.

### 2.5.4. Aplicabilidade

Nesta fase o papel modificado foi testado numa escala real, isto é, foi utilizado para despistar os níveis de sulfadiazina presentes em águas de aquacultura.

Inicialmente preparou-se soluções de SDZ com água de poço com as seguintes concentrações  $3 \times 10^{-3}$ ,  $9 \times 10^{-4}$ ,  $7 \times 10^{-4}$  M, de seguida colocou-se em cada tubo de ensaio um sensor seguido de 2ml da solução em estudo, e regista-se as alterações verificadas.



### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Reações de desenvolvimento com a sulfadiazina

##### 3.1.1. Agentes complexantes inorgânicos

Por complexação com compostos orgânicos, os metais podem conferir cor a soluções aquosas, esta e a sua intensidade dependem das espécies intervenientes e do meio. O objetivo deste trabalho foi obter um complexo que garanta a formação de cor quando em contacto com a SDZ, para que a deteção final possa ser realizada por comparação.

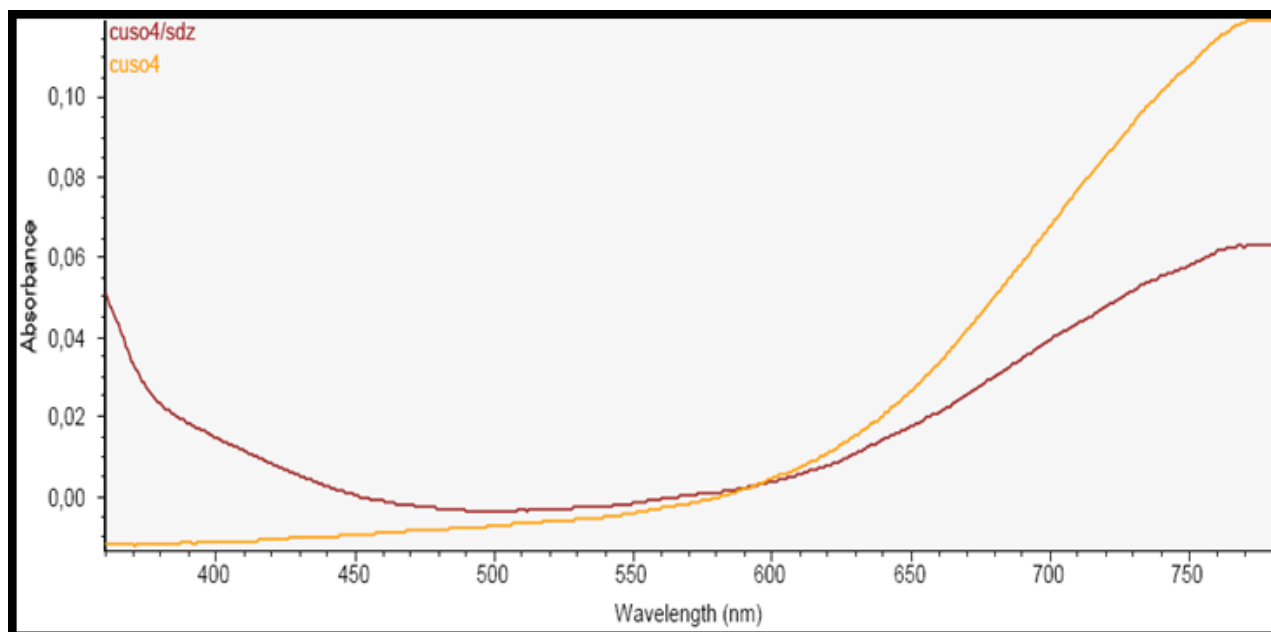
A espécie orgânica em estudo foi a SDZ e as espécies inorgânicas foram manganésio, ferro, chumbo, cobre, alumínio, magnésio, zinco e iodo.

**Tabela 3. 1** - Cores das soluções de agentes complexantes inorgânicos, antes e depois da adição de SDZ

Agente	Cor inicial	Cor final
	Agente	Agente + SDZ
$\text{KMnO}_4$	Roxa	Roxa
$\text{FeCl}_3$	Amarela	Amarela
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	Incolor	Incolor
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Azul	Rosa
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$	Incolor	Incolor
$\text{MgCl}_2$	Incolor	Incolor
$\text{ZnCl}_2$	Incolor	Incolor
$\text{I}_2$	Alaranjada	Alaranjada

Como se pode verificar pela tabela 3.1. somente o cobre reagiu com a SDZ passando de uma solução azul, característica da solução aquosa de sulfato de cobre a rosa devido ao precipitado que se forma quando a SDZ reage com o cobre.

Para todas as soluções mediu-se a absorvância, estando todos os espetros obtidos no anexo A, como se pode verificar na figura 3.1, o espetro referente à reação entre o sulfato de cobre e a SDZ, não tem qualquer valor prático devido à formação do precipitado que **impede a leitura da absorvância**.



**Figura 3.1** – Espectro de absorvância de sulfato de cobre e deste com SDZ

### 3.1.2. Agente complexante orgânico

O agente complexante orgânico terá como função ajudar a fixar o  $\text{Cu}^{2+}$  ao papel quimicamente modificado. Os agentes complexantes em estudo foram EDTA (etilenodiamina), amoníaco, acetato de amónio, acrilamida, N-ter-butil-acrilamida, tris(hidroximetil)aminometano, cloridrato de trietanolamina.

As alterações da adição de SDZ ao agentes foram registadas por esptrofotometria UV/VIS estando representados os espectros de absorvancia de cada agente complexante e da mistura dos mesmos com a SDZ no anexo B.

De todos os agentes complexantes usados os que fornecem melhores resultados são o EDTA e o acetato de amonio pois foram os único que reduziram aproximadamente para metade a absorvancia quando se adicionou a SDZ à solução de cobre mais agente complexante, como se pode verificar nas figuras 3.2 e 3.3.

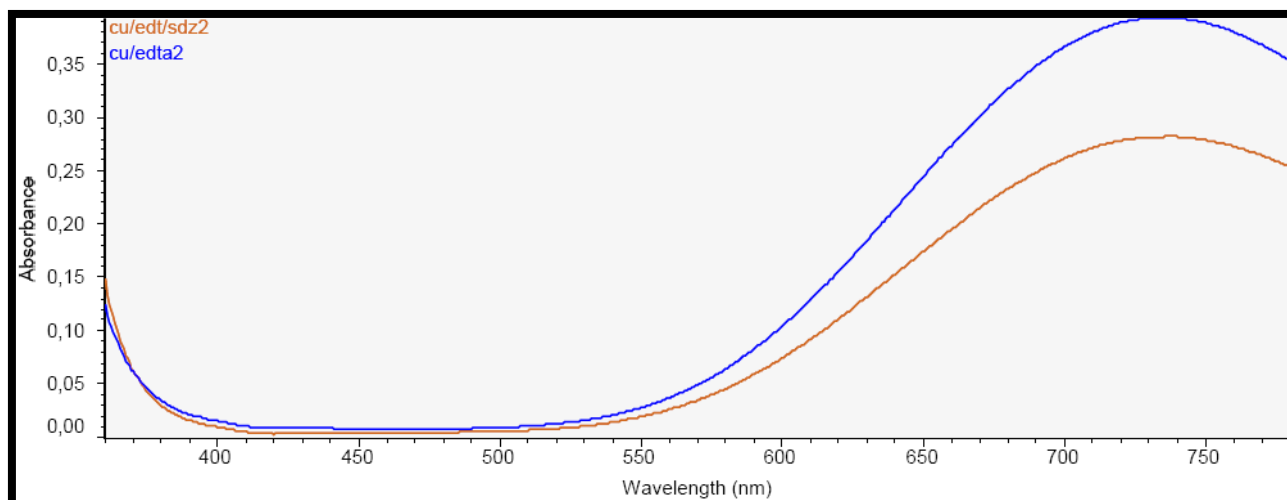


Figura 3.2 - Espectro de absorvância de EDTA, deste com o cobre e com a SDZ

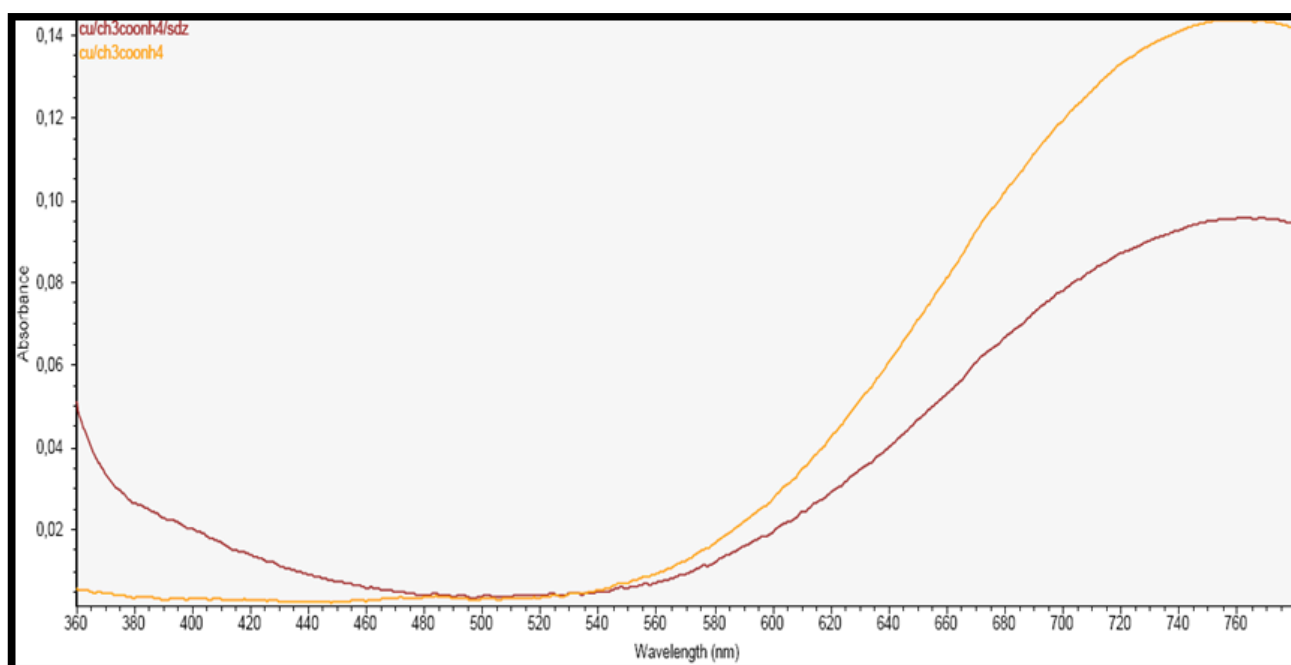


Figura 3.3 – Espectro de absorvância de acetato de amónio, deste com o cobre e com a SDZ

### 3.2. Modificação química do papel

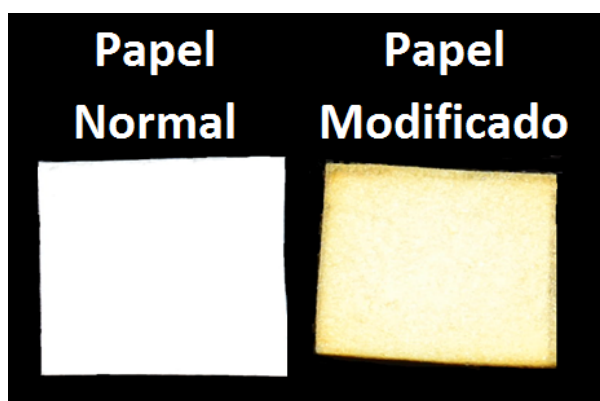
Nesta fase do estudo o objetivo era a imobilização das especies inorganicas num suporte de papel para reduzir o procedimento analitico de deteção da SDZ numa água de aquacultura, quando mergulhado num frasco de eppendorf com a amostra.

A modificação química do papel foi realizada em duas etapas, a carboxilação da superfície e a construção de uma monocamada que teria o cobre adsorvido para reagir com a SDZ.

### 3.2.1. Carboxilação da superfície

A oxidação de celulose por periodato é caracterizada pela quebra específica na ligação C-C glicosídica, ou seja, a ligação entre os carbonos C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> da unidade amidoglucose de celulose, resultando a formação de dois agrupamentos aldeídicos por unidade glicosídica (**dialdeidoctulose**). (9)

A figura 3.4 mostra as alterações ocorridas no papel quimicamente modificado, como se pode verificar o papel adquire uma cor amarelada (como papel envelhecido) e ocorre uma visível redução de tamanho.

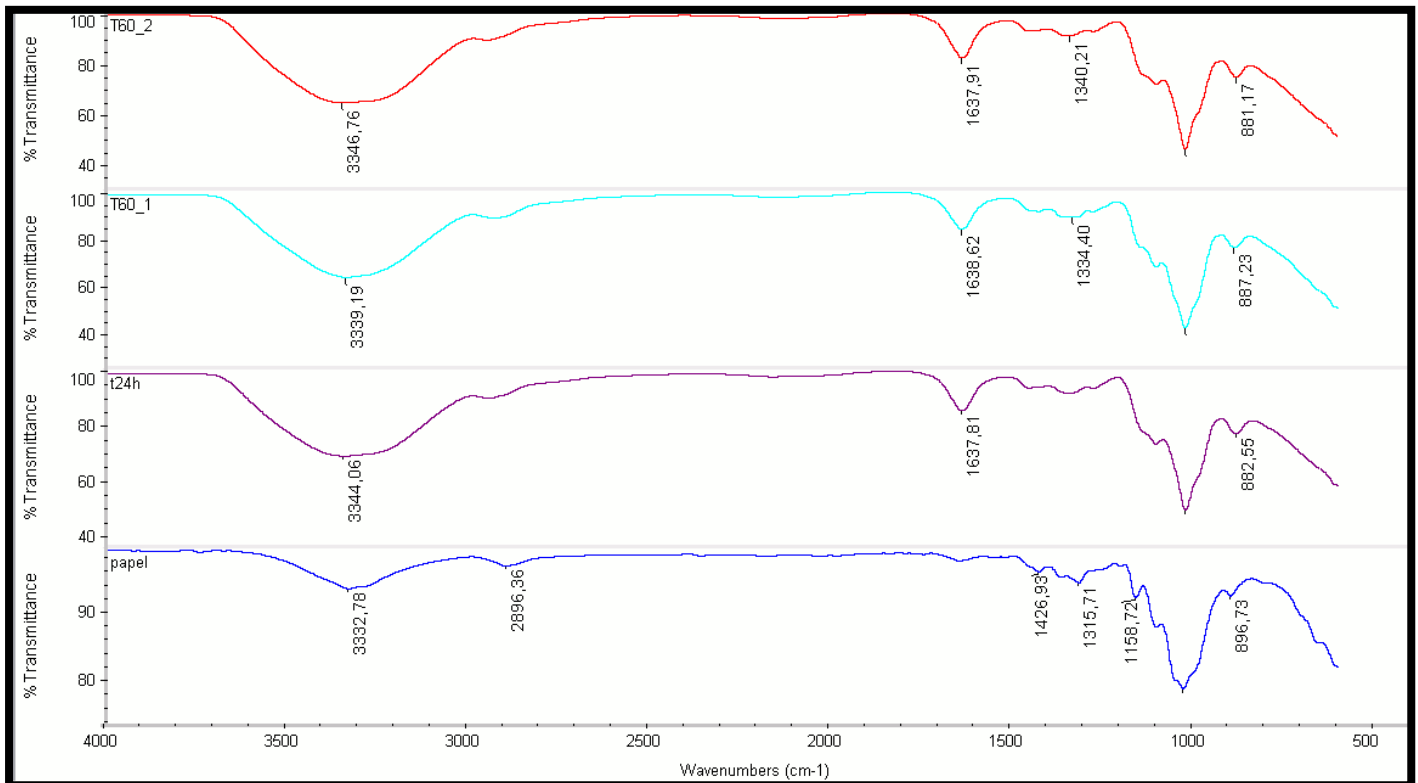


**Figura 3.4** – Fotografia do papel antes da modificação e depois da modificação química

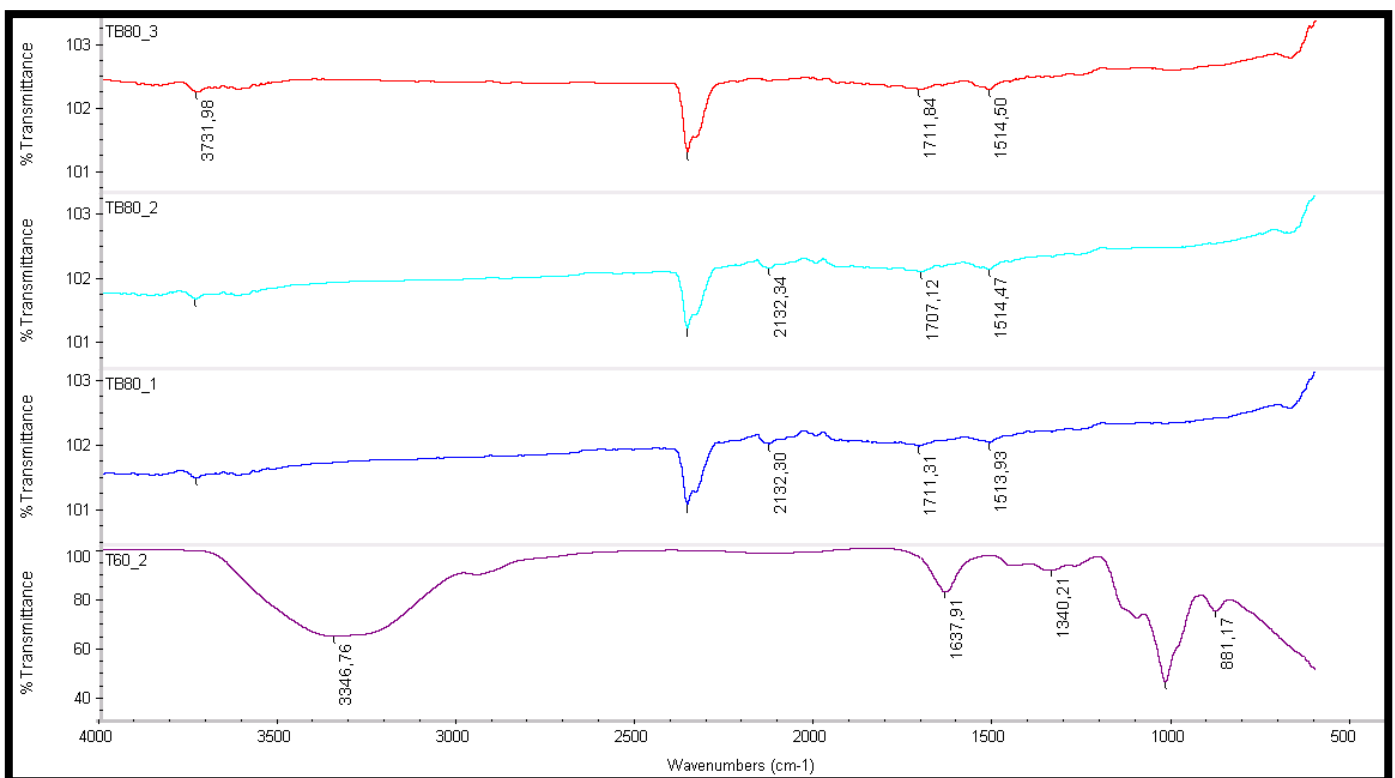
Para cada uma das variáveis estudadas na modificação do papel procedeu-se ao controlo dessa modificação através da análise de superfície por FTIR. Foram vários os espectros reunidos neste estudo, apresentados no anexo B.

A Figura 3.5 reúne os espectros de FTIR decorrentes do ensaio à temperatura ambiente decorrido 24h e à temperatura de 60°C decorrido 1h e 2h do início do ensaio, incluem-se aqui os espectros relativos ao papel de celulose.

A Figura 3.6 reúne os espectros de FTIR decorrentes do ensaio à temperatura de 80°C decorrido 1h e 2h do início do ensaio.



**Figura 3.5** - Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel e do papel modificado obtido, relativos à temperatura ambiente e a 60°C nos respetivos tempos de reação.

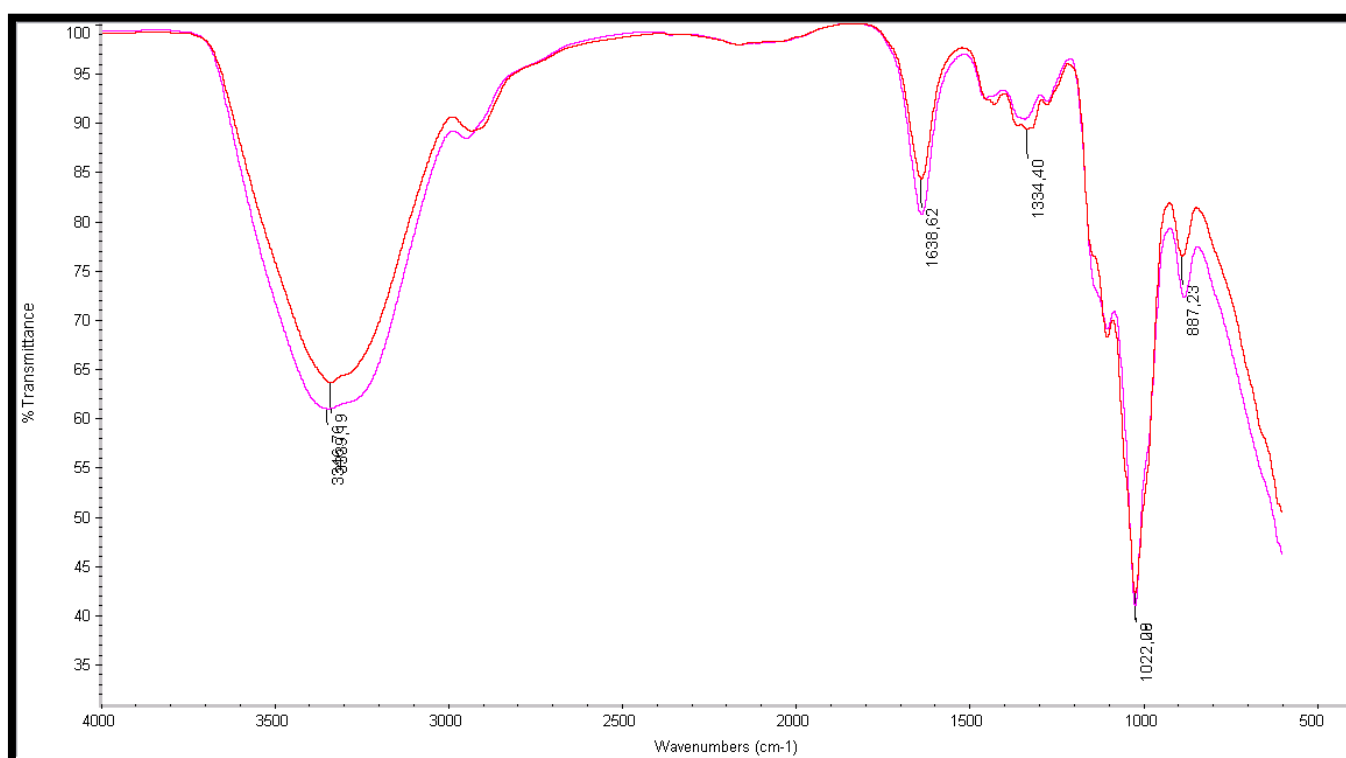


**Figura 3.6** - Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel relativos à temperatura de 60 e 80°C nos respetivos tempos de reação.

O espectro típico da celulose (papel) presente na figura X apresentou uma banda larga de estiramento da ligação O-H, por volta dos  $3300\text{ cm}^{-1}$ , presente nos grupos hidroxilo da celulose, também apresentou um pico de forte intensidade por volta dos  $1100\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação C-O.

Dos vários ensaios efetuados só se verificou resultados positivos quando à temperatura ambiente decorrido 24 horas do início do ensaio e à temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  ao fim de uma hora e duas horas, onde nos três espectros ocorre um alargamento do pico por volta dos  $3340$  a  $3350$ , indicando a presença de ácidos carboxílicos e o aparecimento de um pico entre  $1635$  e  $1640\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao grupo carbonilo que indica a modificação química do papel.

Apesar destes três espectros apresentarem o pico referente à oxidação da celulose escolheu-se o ensaio efetuado à temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  durante duas horas, pois é mais rápido do que o ensaio efetuado à temperatura ambiente e é o pico que apresenta maior intensidade (pico rosa), como se pode verificar na figura 3.7.











**Figura 3.7** - Espectros de FTIR dos vários intervenientes na modificação do papel relativos à temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  ao fim de 1h (vermelho) e de 2h (rosa)

### 3.2.2. Layer-by-layer

Nesta fase do estudo, avaliou-se a melhor forma de adsorver o cobre na superfície do papel quimicamente modificado, para tal, criou-se monocamadas sobre o papel quimicamente modificado.

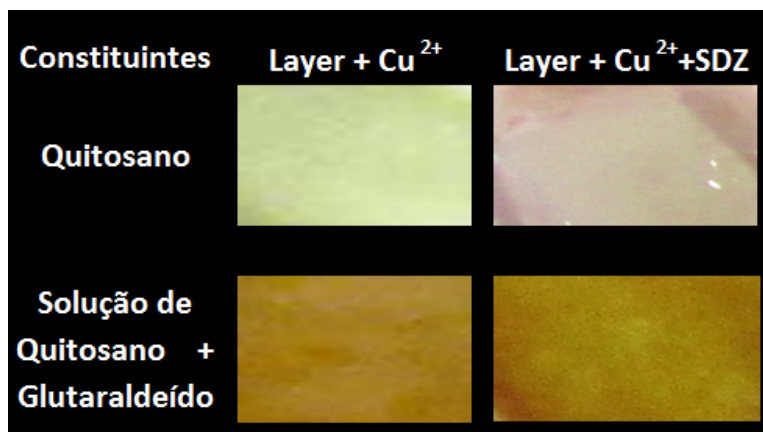
Na figura 3.8 estão representadas os ensaios realizados, um ensaio onde a primeira camada é o glutaraldeído seguido de quitosano e por fim o cobre, outro ensaio a primeira camada era de quitosano precedido de glutaraldeído e por fim o cobre; uma só camada de quitosano seguido do cobre e um último ensaio sendo, a primeira camada uma solução de quitosano com glutaraldeído seguido do cobre.

Constituintes	Layer	Layer + Cu <sup>2+</sup>
Glutaraldeído + Quitosano		
Quitosano + Glutaraldeído		
Quitosano		
Solução de Quitosano + Glutaraldeído		

**Figura 3.8-** Ensaio para a construção da monocamada

Como se pode verificar na figura 3.8 depois de adsorver o cobre só no ensaio com a monocamada de quitosano é que se verifica uma alteração da cor, passando de amarelo para um tom azul que se deve há adsorção do cobre.

Após a adsorção do cobre adicionou-se uma gota de SDZ no sensor e verificou-se que só no sensor com a monocamada de quitosano houve alteração de cor passando de azul a rosa, como mostra a figura 3.9, verificou-se também que essa alteração de cor se deve à formação de um precipitado à volta do sensor, resultado da reação entre a SDZ e o cobre.



**Figura 3.9**– Resposta do sensor à adição de SDZ

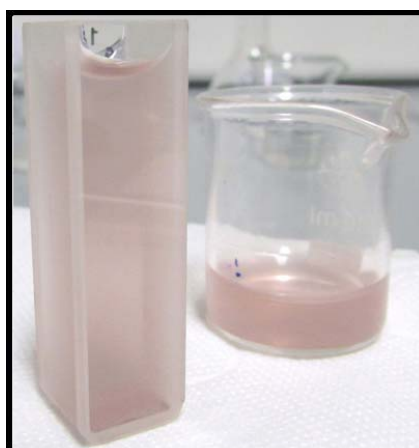
### 3.3. . Verificação da formação de cor

No final dos ensaios do ponto 3.2.2 verificou-se a formação de um precipitado à volta do sensor, resultado da reação entre a SDZ e o cobre, face a este acontecimento foi necessário efetuar uma verificação da formação de cor entre o cobre com acetato de amónio e a SDZ a diferente pH.

Na tabela 3.2 está registado as alterações verificadas nas reações de acetato de amónio com sulfato de cobre, é de notar que o catião Cu<sup>2+</sup> isolado conferiu uma tonalidade cor azul água, tipicamente característica desta espécie em solução aquosa. Quando misturada com a SDZ, a solução forma um precipitado rosa como se pode verificar na figura 3.10, que levou a concluir que não era necessário a reação entre o cobre e o acetato de amónio, para a adsorção do cobre no papel., porque o mais importante neste estudo era a mudança de cor obtida, facilmente detetada pelo olho humano. É necessário expressar que a reação de precipitação entre o cobre e a SDZ só ocorre quando a concentração do primeiro é de 10<sup>-2</sup> M.

**Tabela 3.2** – Registo das alterações verificadas na reações com acetato de amónio, sulfato de cobre e SDZ em diferente pH

Reagentes	Observações
<b>Cu + CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> + SDZ (pH= 7,70)</b>	Formação de um precipitado rosa salmão
<b>Cu + CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> + SDZ (pH= 1,05)</b>	Formação de um precipitado rosa salmão
<b>Cu + CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> + SDZ (pH= 11,88)</b>	Formação de um precipitado rosa salmão
<b>CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> + Cu + SDZ (pH= 7,70)</b>	Não se verifica qualquer alteração
<b>CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> + Cu + SDZ (pH= 1,05)</b>	Não se verifica qualquer alteração
<b>CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> + Cu + SDZ (pH= 11,88)</b>	Não se verifica qualquer alteração
<b>Cu + SDZ (pH= 7,69)</b>	Precipitado rosa
<b>CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> + SDZ (pH= 7,54)</b>	Solução incolor



**Figura 3.10** - Reação de precipitação entre a SDZ e o cobre

Para a verificação dos elementos constituintes do precipitado efetuou-se dois ensaios, o primeiro consistiu na adição de umas gotas de ácido sulfúrico ao precipitado seco e verificou-se que este que apresenta uma cor roxeada se dissolve e origina uma solução azulada (como pode ver na figura 3.11) característico do cobre II, logo pode-se afirmar que o precipitado é formado por cobre II. DE seguida procedeu-se ao controlo através do FTIR e como pode verificar na figura 3.12 no complexo representado pela cor verde esta presente um pico nos 1400nm característico da SDZ, o que se pode afirmar que no precipitado formado esta presente a SDZ.

Generalizando, a reação entre a SDZ e o cobre origina um complexo ternário de cobre II, como mostra a figura 3.13. (8)

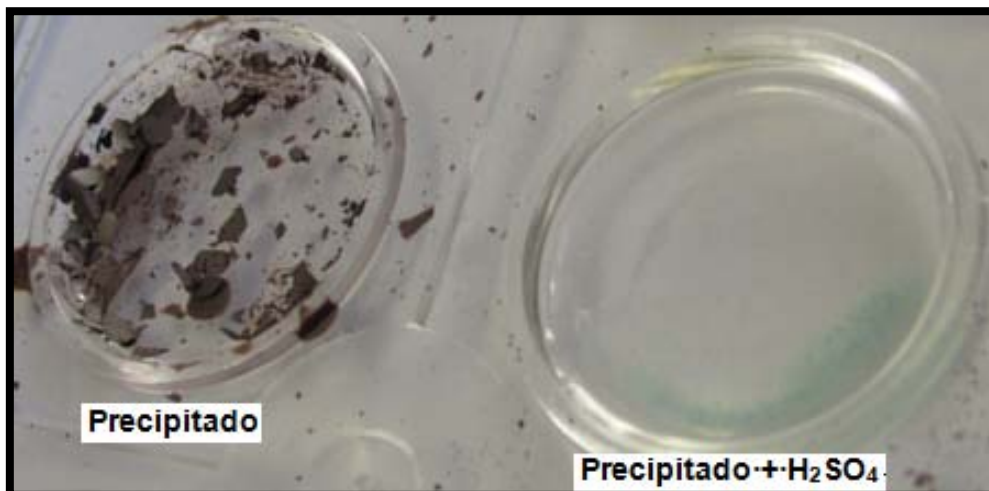


Figura 3.11 – Reação entre o precipitado e ácido sulfúrico

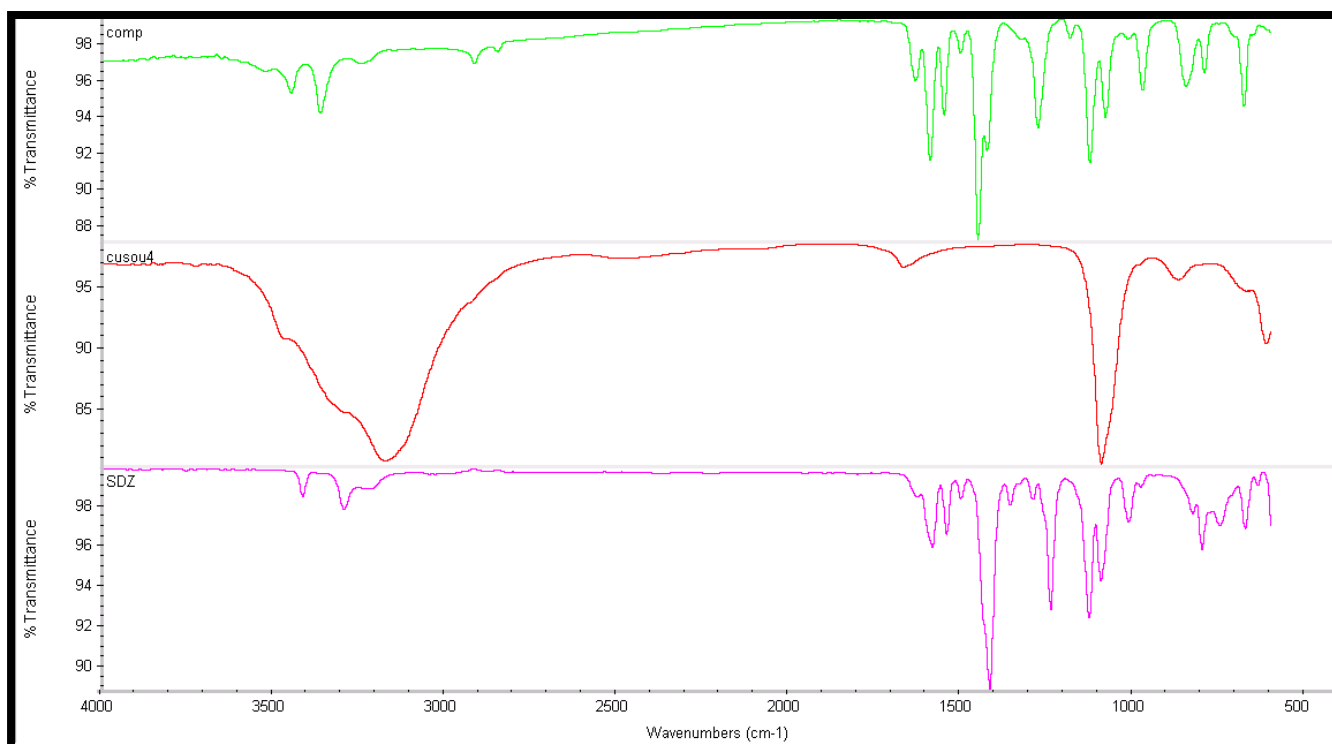


Figura 3.12 – Espectros da SDZ, de sulfato de cobre e do precipitado formado

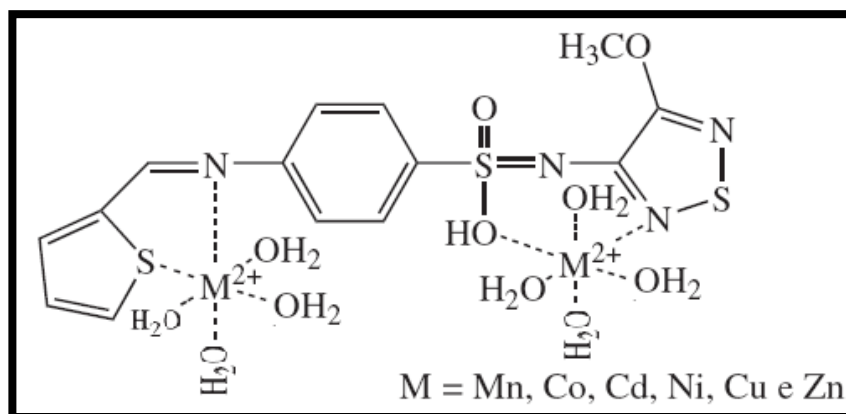


Figura 3.13 – Complexo ternário de cobre (8)

### 3.4. Caracterização analítica

#### 3.4.1. Gama de linearidade

O objetivo desta fase era a calibração do sensor, para tal, mergulhou-se o sensor numa gama alargada de concentrações de SDZ. As diferentes cores obtidas foram registadas por fotografia conjunta de modo a eliminar variações de cor e de luminosidade ambiente. Depois a imagem foi importada para o programa “Paint” do Windows com o intuito de adquirir as coordenadas da cor pelo código RGB:

Inicialmente a gama de concentração em estudo foi de  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  M.

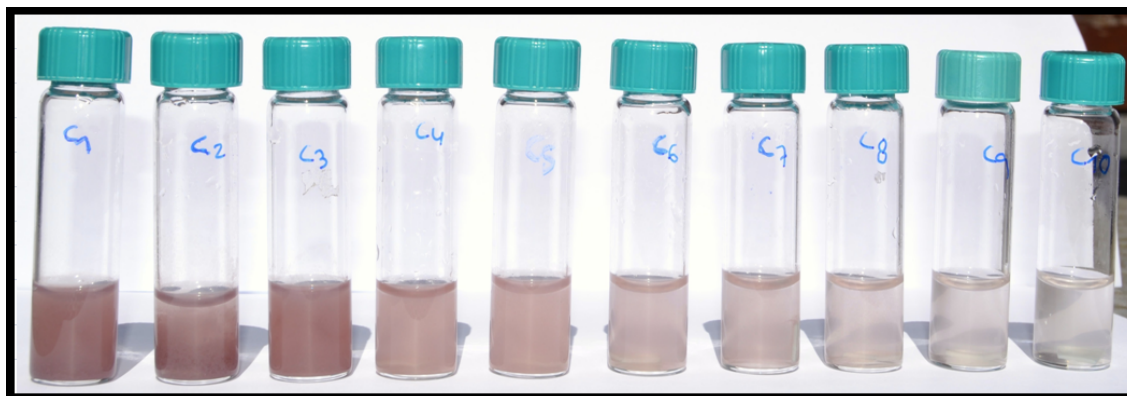


Figura 3.14 - Ensaios gama de linearidade para as respetivas concentrações  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  M

Ao observar figura 3.14 onde está representada a fotografia dos ensaios verificou-se que só nos ensaios C1, C2 e C3 com as respetivas concentrações  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  se verificou a formação do precipitado.

Face a estes resultados decidiu-se alargar a gama de concentrações, sendo as novas concentrações de  $5 \times 10^{-3}$ ,  $4 \times 10^{-3}$ ,  $3 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $9 \times 10^{-4}$ ,  $8 \times 10^{-4}$ ,  $7 \times 10^{-4}$ ,  $6 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  M, respetivamente os ensaios C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10.

Verificou-se que a concentração mínima de deteção é de  $5 \times 10^{-4}$  M, ou seja, o ensaio C10.



**Figura 3.15** – Ensaio gama de linearidade para as respetivas concentrações  $5 \times 10^{-3}$ ,  $4 \times 10^{-3}$ ,  $3 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $9 \times 10^{-4}$ ,  $8 \times 10^{-4}$ ,  $7 \times 10^{-4}$ ,  $6 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  M

Como já foi mencionado anteriormente, depois de tirada a fotografia esta foi importada para o programa “Paint” do Windows onde se colheu as coordenadas RGB para as diferentes concentrações representadas na tabela 3.3, com o intuito de obter da paleta da cor representada na figura 3.16, que futuramente será usada como modelo de comparação.



**Tabela 3.3** - Coordenadas de cor das imagens do sensor em diferentes concentrações de OXI, obtidas por fotografia.

Ensaio	Cor virtual				Media	Cor original
C1	Vermelho	156	171	161	161	
	Verde	109	120	114	114	
	azul	113	119	118	118	
Ensaio						Cor original
C2	Vermelho	176	174	156	174	
	Verde	128	122	111	122	
	Azul	130	123	114	123	
Ensaio						Cor original
C3	Vermelho	184	178	182	182	
	Verde	135	121	130	130	
	Azul	139	121	133	133	
Ensaio						Cor original
C4	Vermelho	209	219	214	214	
	Verde	166	176	171	171	
	Azul	167	177	171	171	
Ensaio						Cor original
C5	Vermelho	220	222	214	220	
	Verde	179	184	171	179	
	Azul	179	185	172	179	
Ensaio						Cor original
C6	Vermelho	230	232	221	230	
	Verde	205	207	191	205	
	Azul	210	212	198	210	
Ensaio						Cor original
C7	Vermelho	232	231	225	231	
	Verde	207	203	196	203	
	Azul	212	208	199	208	
Ensaio						Cor original
C8	Vermelho	240	235	243	240	
	Verde	222	216	225	222	
	Azul	227	221	227	227	
Ensaio						Cor original
C9	Vermelho	239	241	240	240	
	Verde	223	225	221	223	
	Azul	232	232	229	232	
Ensaio						Cor original
C10	Vermelho	240	232	236	236	
	Verde	228	218	223	223	
	Azul	235	224	231	231	



Figura 3.16 – Paleta de cor obtida para as várias concentrações

### 3.4.2. Seletividade

A seletividade de um sensor relativamente ao composto para o qual foi “criado” é uma das características mais importantes do ponto de vista analítico. Para esse fim os sensores foram colocados em contacto com outros antibióticos utilizados em aquacultura.

Os antibióticos escolhidos foram sulfatiazol, sulfametoxazol, tetraciclina e difloxacina para uma concentração de  $1 \times 10^{-3}$  M.

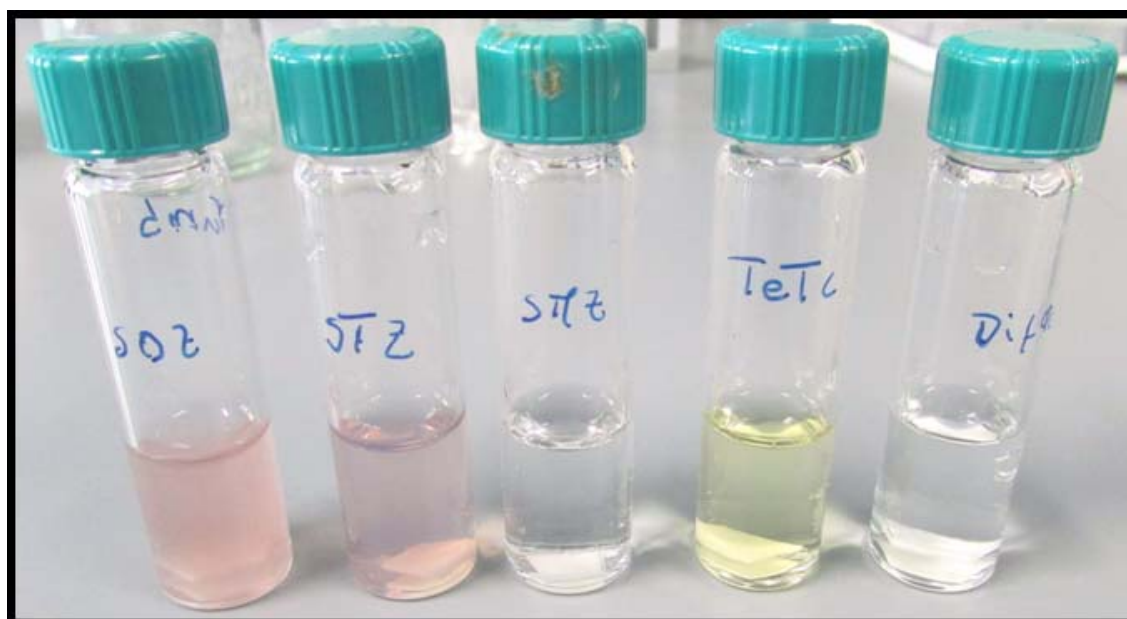


Figura 3.17 – Fotografia do ensaio de seletividade para os vários antibióticos

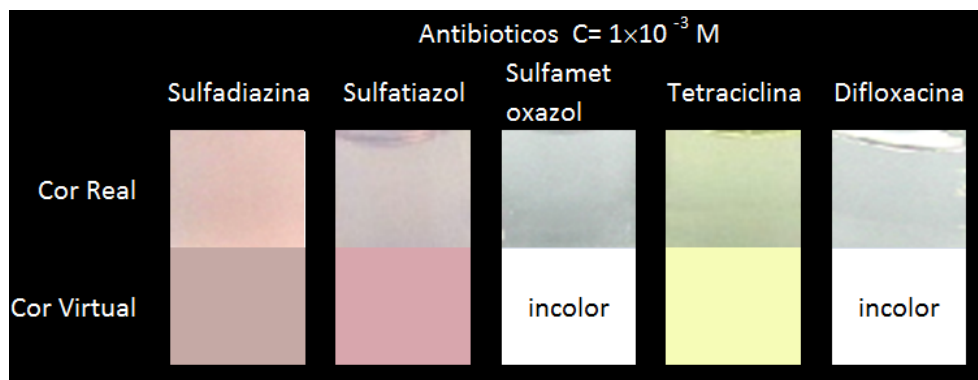


Figura 3.18– Paleta de cores obtidas para os vários antibióticos

Como se pode verificar nas figuras 3.17 e 3.18 só se obtém precipitado quando em contacto com a SDZ, o sensor quando em contato com o STZ também reage passando a solução inicial de incolor a rosa, em relação aos restantes antibióticos não se verifica qualquer reação. Podemos dizer que o sensor só reage com a SDZ e com STZ e não com o SMZ porque o átomo de azoto aqui está ligado a um átomo de oxigénio, o que poderá impedir a reação entre o azoto e o cobre.

### 3.4.3. Estabilidade

Estudou-se a estabilidade do sensor quando armazenado à temperatura ambiente durante um período de 15 dias e quando armazenado em água destilada no frigorífico durante o mesmo período de tempo.

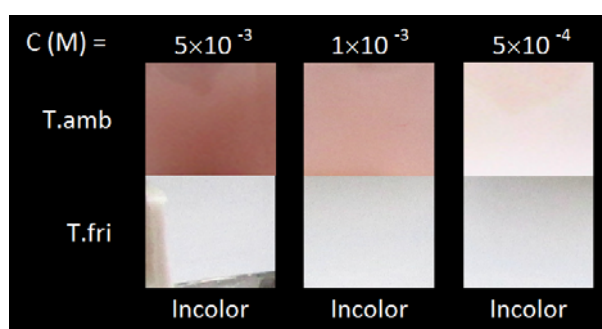


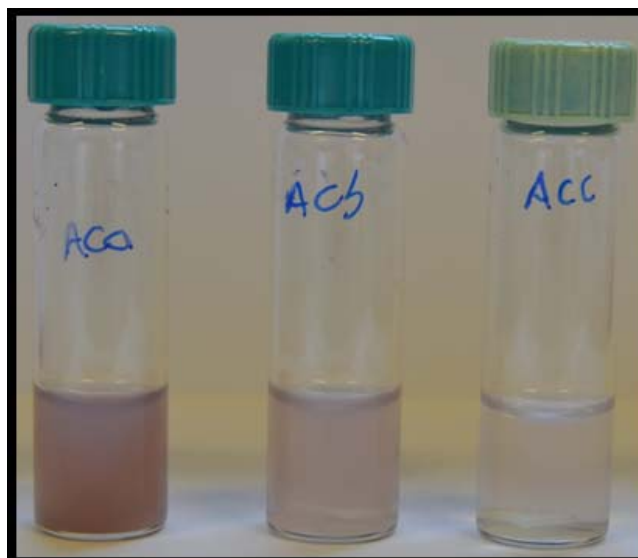
Figura 3.19– Estabilidade do sensor quando armazenado à Temperatura ambiente e no frigorífico

Quando se mergulhou o sensor na solução de SDZ verificou-se que o sensor armazenado em água destilada no frigorífico, estava inativo, não ocorrendo a reação desejada entre o cobre do sensor e a SDZ, como se pode verificar na figura 3.19 a solução continuou incolor após adição do sensor. No que diz respeito ao sensor armazenado à temperatura ambiente durante quinze dias verificou-se que a reação é um pouco mais lenta do que ocorre quando o sensor é feito e utilizado no mesmo dia, contudo como se verifica na figura anteriormente o sensor responde da mesma forma

tanto quando elaborado e utilizado no mesmo dia como quando armazenado à temperatura ambiente.

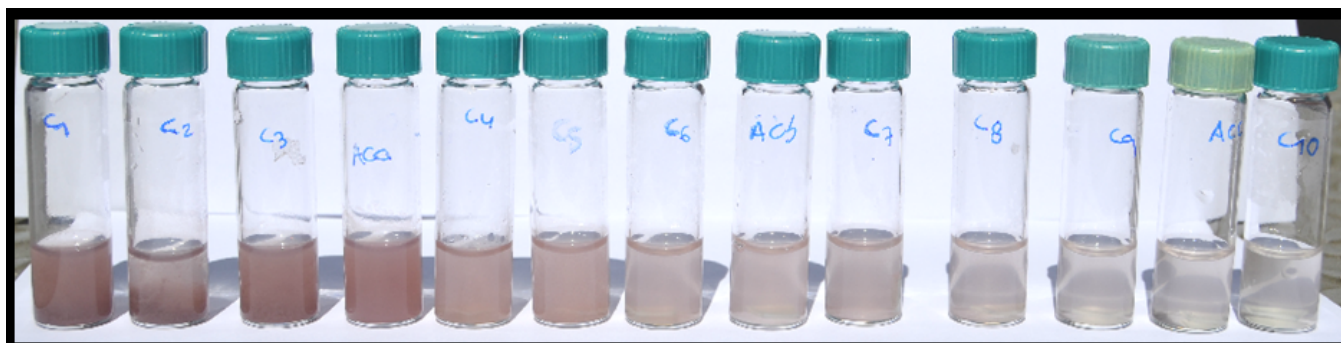
#### 3.4.4. Aplicabilidade

O sensor foi testado numa escala real, ou seja, utilizado para despistar os níveis de SDZ presentes em águas de aquacultura. Tendo em conta que as águas de aquacultura são as amostras ambientais mais propícias à existência de antibióticos, este sensor pode também ser usado no despiste de antibióticos em águas ambientais de outras origens, como águas provenientes de rios, poços, lagos, entre outros. Os sensores foram testados numa amostra dopada com SDZ com as seguintes concentrações, a  $3 \times 10^{-3}$ ,  $8 \times 10^{-4}$ ,  $7 \times 10^{-4}$  M. Os resultados foram registados em fotografia como mostra a figura 3.20.



**Figura 3.20** – Resultados obtidos numa água dopada

Para identificar a concentração de SDZ presente na água dopado os ensaios foram alinhados os outros tubos de ensaio com a gama de linearidade em estudo, como mostra a figura 3.21.



**Figura 3.21** - Resultados obtidos da gama de linearidade e os ensaios da água dopada

De seguida os resultados foram registados por fotografia e como foi mencionado anteriormente com o auxílio do programa “paint” obteve-se a seguinte paleta onde se pode comparar as cores dos ensaios obtidos anteriormente e a cor obtida na água dopada, concluindo que as concentrações dos ensaios Aca, Acb e Acc são respetivamente  $3 \times 10^{-3}$ ,  $9 \times 10^{-4}$  e  $6 \times 10^{-4}$  M.



**Figura 3.22** - Paleta de gama de linearidade com os resultados de água dopada.

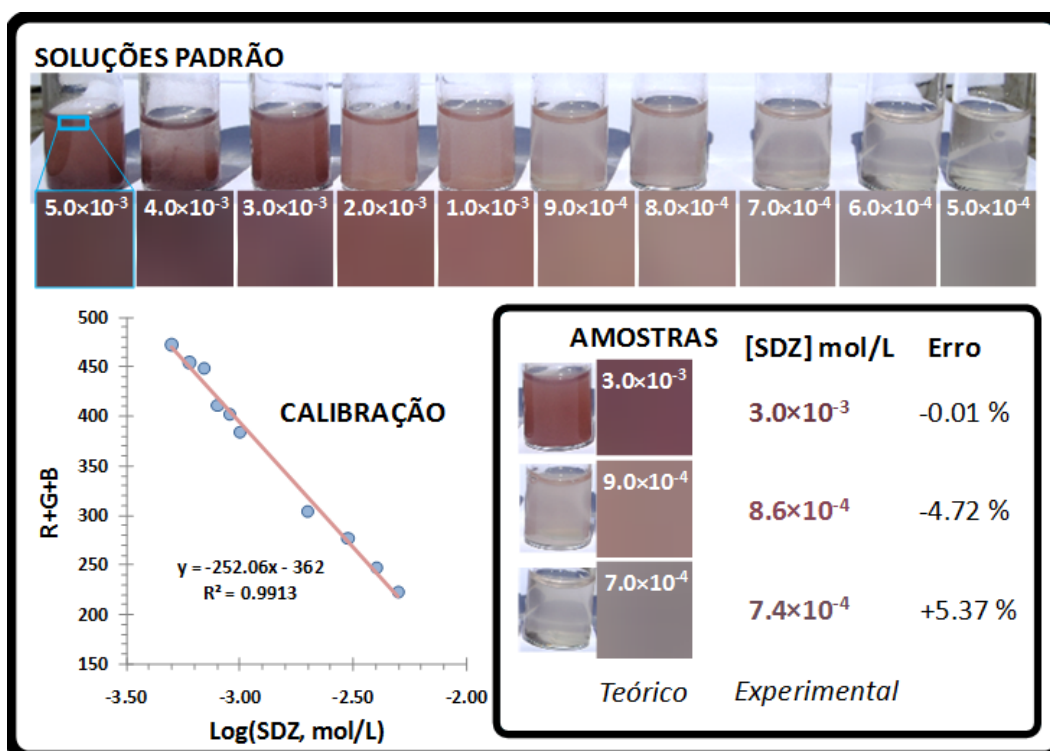
Posteriormente, com o intuito de obter uma curva de calibração fez-se vários testes onde se variou os pontos de leitura e os modelos, concluiu-se que o mais adequado é estabelecer a leitura da cor na interface entre o líquido e o ar, como mostra a figura 3.20.

A relação é linear para todas as concentrações testadas, sendo Y, R+G+B, ou seja, a soma das 3 coordenadas e X o logaritmo da concentração, os erros das amostras são mínimos uma vez que é inferior a 10%, mesmo para as amostras de menor concentração.



**Tabela 3.4** – Coordenadas de cor das imagens dos sensores em água dopada obtidas por fotografia.

Ensaio	C (M)	Cor virtual	Amostra							Cor original
			1	2	3	4	5	6	Media	
Aca	$3 \times 10^{-3}$	Vermelho	114	114	128	121	117	114	115,5	
		Verde	74	70	85	76	78	72	75,0	
		Azul	82	78	99	84	89	83	83,5	
		Tonalidade	232	233	227	233	229	230	230,7	
		Saturação	51	57	48	55	48	54	52,2	
		Luminosidade	88	87	100	93	92	88	91,3	
Acb	$9 \times 10^{-4}$	Vermelho	162	153	153	158	158	153	155,5	
		Verde	131	123	123	132	133	122	127,0	
		Azul	135	123	122	134	135	120	128,5	
		Tonalidade	235	0	1	237	237	2	118,7	
		Saturação	34	31	32	28	27	33	30,8	
		Luminosidade	148	130	129	136	137	128	134,7	
Acc	$7 \times 10^{-4}$	Vermelho	154	145	151	161	153	150	152,0	
		Verde	142	131	133	150	138	135	136,5	
		Azul	144	131	134	152	142	136	139,0	
		Tonalidade	233	0	237	233	229	238	195,0	
		Saturação	12	14	15	13	16	29	16,5	
		Luminosidade	139	130	132	146	137	143	137,8	



**Figura 3.23** - Curva de calibração

## 4. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

No que diz respeito aos ensaios em solução aquosa, foi possível constatar que a espécie capaz de formar de produtos corados na presença de SDZ foi o cobre II ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Quanto ao agente complexante orgânico concluiu-se que não era necessário o seu uso, uma vez que o cobre reage diretamente com a SDZ originando o complexo ternário de cobre II.

A modificação química do papel de celulose produziu uma camada aminada externa sobre a superfície sólida, sendo esta camada capaz de se ligar às espécies metálicas carregadas positivamente. Para a adsorção de  $\text{Cu}^{2+}$  ao papel quimicamente modificado, criou-se uma camada de quitosano sobre o papel. A otimização deste processo permitiu obter um intervalo de deteção de  $5 \times 10^{-3}$  a  $5 \times 10^{-4}$  M.

A resposta de sensor a outros antibióticos é a pretendida, uma vez que reage de diferente maneira para cada antibiótico, mesmo dentro da mesma família de antibióticos, o que se conclui que o sensor é seletivo.

No que diz respeito à estabilidade podemos dizer que o sensor é estável pelo menos durante um período de 1 mês.

Em relação à curva de calibração após vários estudos concluiu-se que se trata de uma relação linear para todas as concentrações testadas, com Y a soma das 3 coordenadas e X o logaritmo da concentração, verificou-se que os erros das amostras são mínimos, uma vez que é inferior a 10%, mesmo para as amostras de menor concentração.

O sensor produzido ofereceu características muito vantajosas para a sua aplicação local na monitorização de antibióticos em águas de aquacultura, visto que, basta colocar o sensor num frasco de eppendorf adicionar 2ml da amostra em análise, agitar e ver o resultado.

**Contudo necessita de avaliações mais extensas do ponto de vista da sua aplicação prática.**

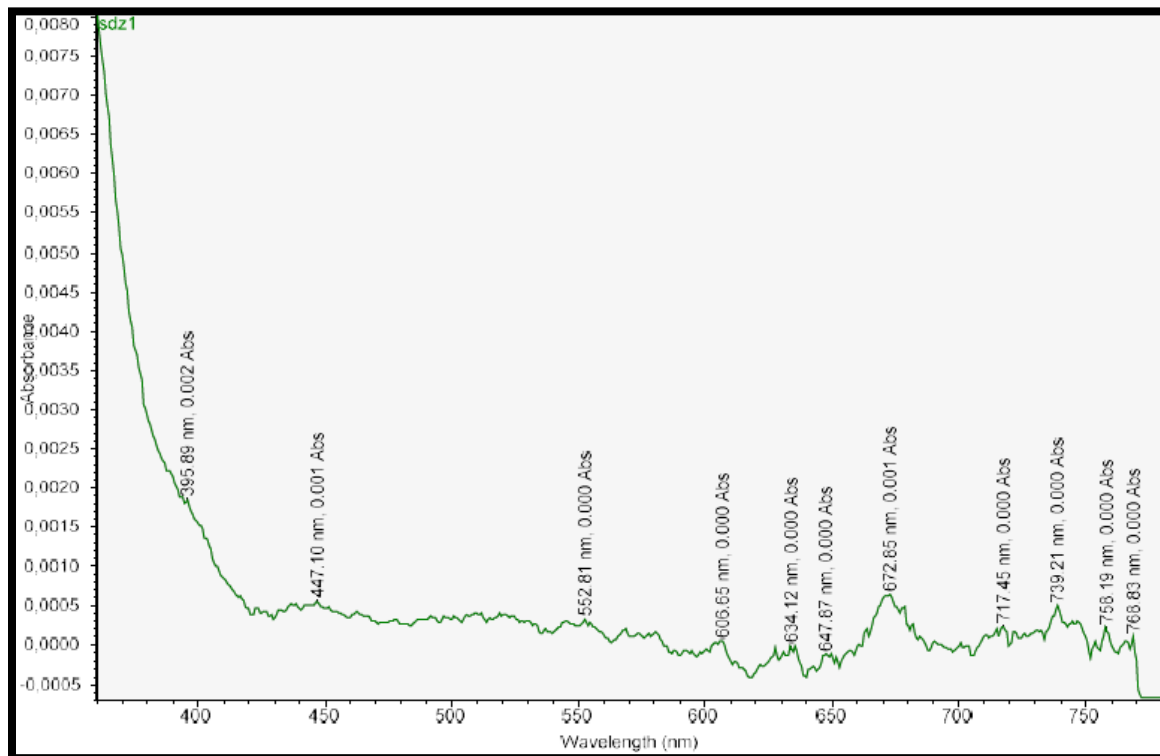


## Bibliografia

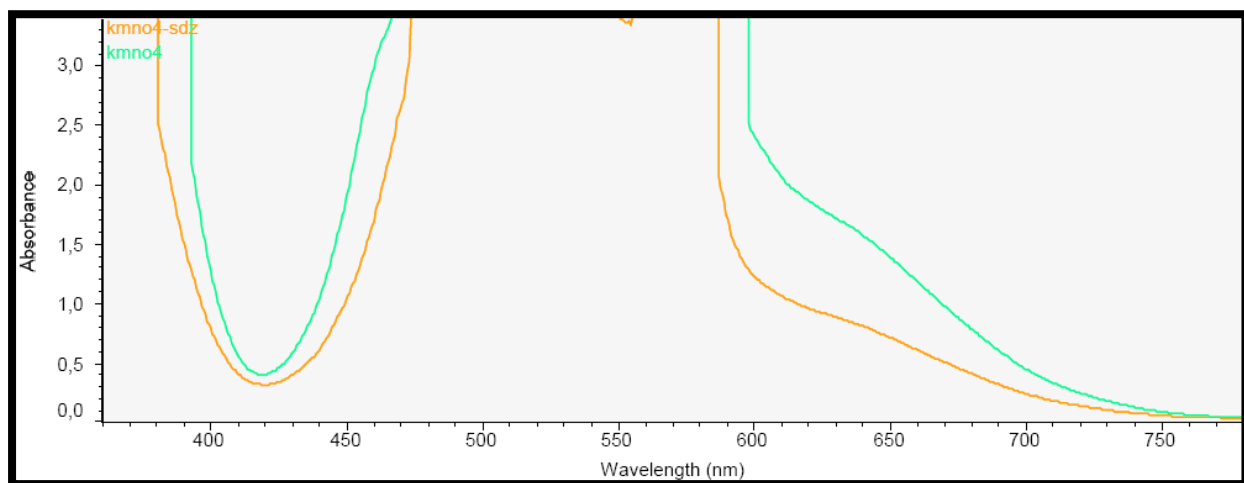
1. **Mestre, Pedro Miguel Garcia.** Elaboração de um Projeto de uma Unidade De Piscicultura. Lisboa : Faculdade de Medicina veterinária da Universidade, 2008.
2. **Food and Agriculture Organization, Cultured Aquatic Species Information.** <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/search>. Food and Agriculture Organization, Cultured Aquatic Species Information. [Online] [Citação: 12 de janeiro de 2013.]
3. **Almeida, Sofia Alexandra Alves.** (Bio)sensores para a detecção/quantificação de. porto : universidade do porto, 2012.
4. **MELO, ARIANA FARIAS.** Desenvolvimento preliminar de um biossensor. Rio de Janeiro : Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
5. **software.intel.** software.intel. [Online] [Citado em: 19 de 11 de 2013.] [http://software.intel.com/sites/products/documentation/hpc/ipp/ippi/ippi\\_ch6/ch6\\_colormodels.html](http://software.intel.com/sites/products/documentation/hpc/ipp/ippi/ippi_ch6/ch6_colormodels.html),
6. **msdn.microsoft.com.** msdn.microsoft.com. [Online] [Citado em: 19 de 11 de 2013.] [http://msdn.microsoft.com/en-us/library/windows/desktop/ms646375\(v=vs.85\).aspx](http://msdn.microsoft.com/en-us/library/windows/desktop/ms646375(v=vs.85).aspx).
7. **Mahjoub Jabli, Faouzi Aloui, Béchir Ben Hassine.** [Copper (II)/cellulose-chitosan] microspheres complex for dye immobilization:isotherm, kinetic and thermodynamic analysis. s.l. : journal of engineered fibers and fabrics, 2013, Vol. 8.
8. **Diego Pessoa Rocha, Gabriel Ferreira Pinto, Reinaldo Ruggiero, Carlos Alberto de Oliveira e Wendell Guerra, Ana Paula Soares Fontes e Tatiane Teixeira Tavares, Ivana Marques Marzano e Elene Cristina Pereira-Maia.** Coordenação de metais a antibioticos como uma estratégia de combate à resistencia bacteriana.
9. **lume.ufrgs.** [Online] [Citado em: 8 de julho de 2013.] <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/35226/000614143.pdf?sequence=1>
10. **Tâmara I.B.Silva, Felismina T.C.Moreira, Liliana A.A.N.A.Truta, M.Goreti F.Sales.** Novel optical PVC probes for on-site detection/determination of fluoroquinolones in a solid/liquid interface: Application to the determination of Norfloxacin in aquaculture water: BioMark/ISEP, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2012



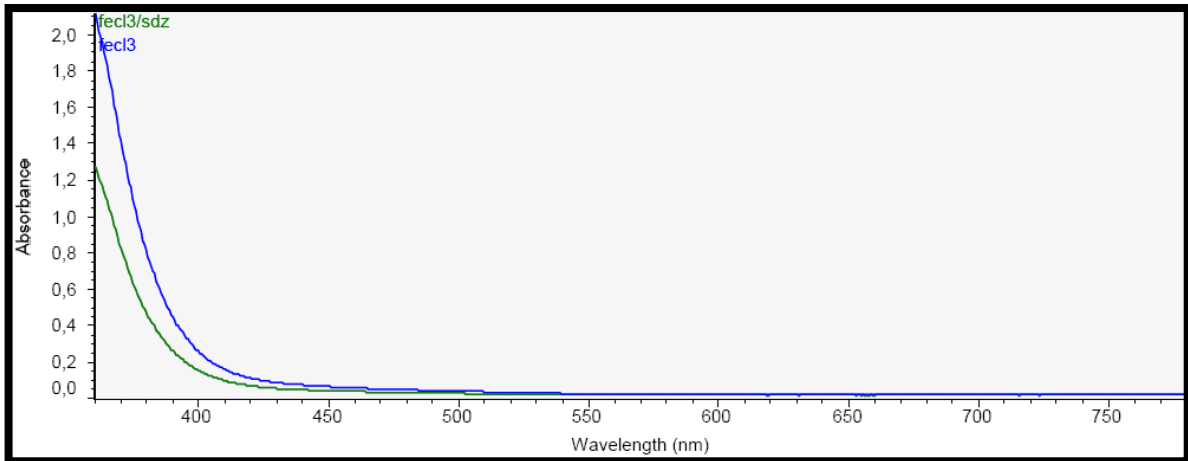
## **Anexo A.** ***Agentes complexantes inorgânicos***



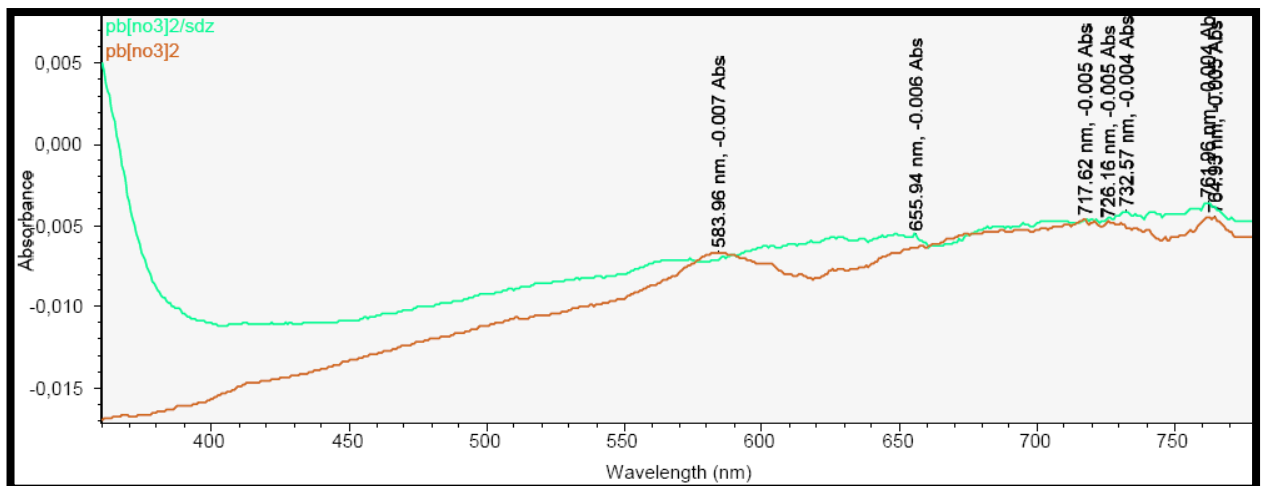
**Figura A.1** – Espectro de absorvância da SDZ



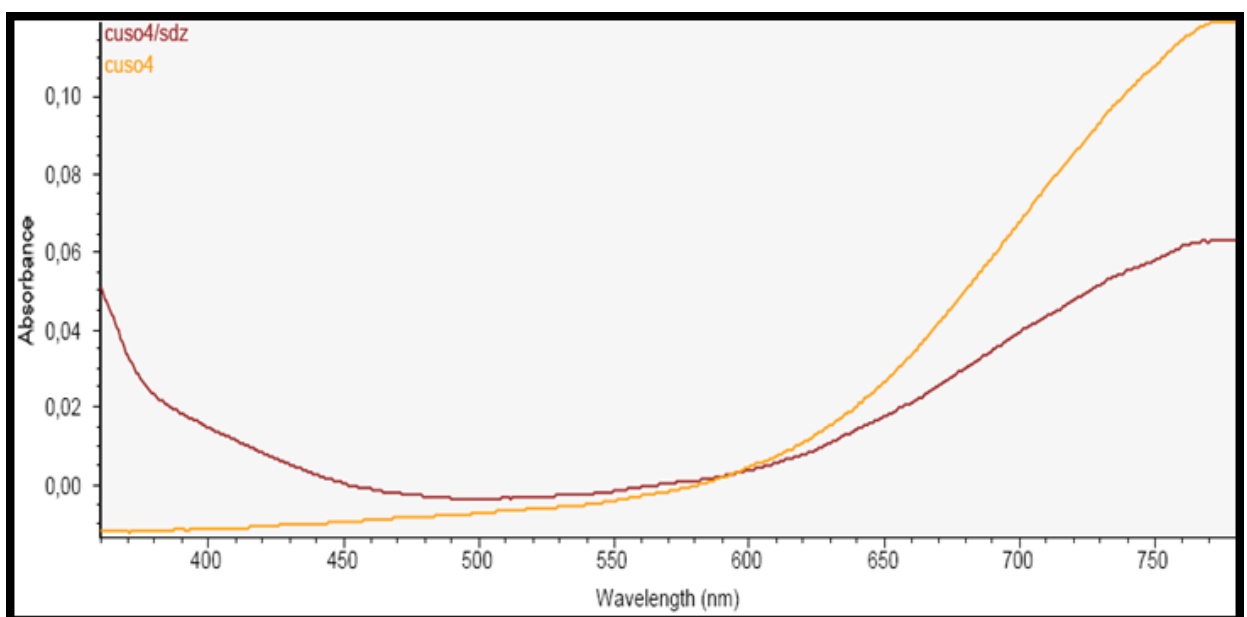
**Figura A.2** – Espectro de absorvância de permanganato de potássio e deste com SDZ



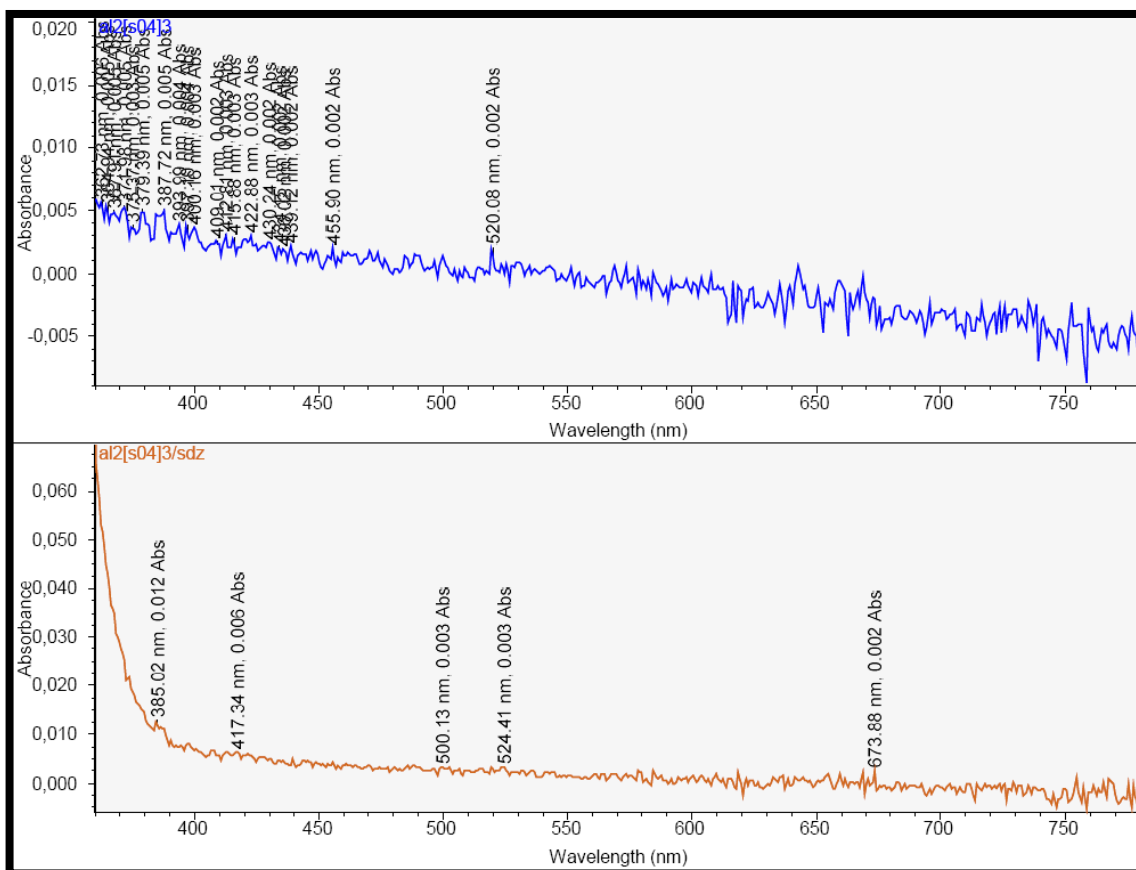
**Figura A.3** – Espectro de absorvância de cloreto de ferro e deste com SDZ



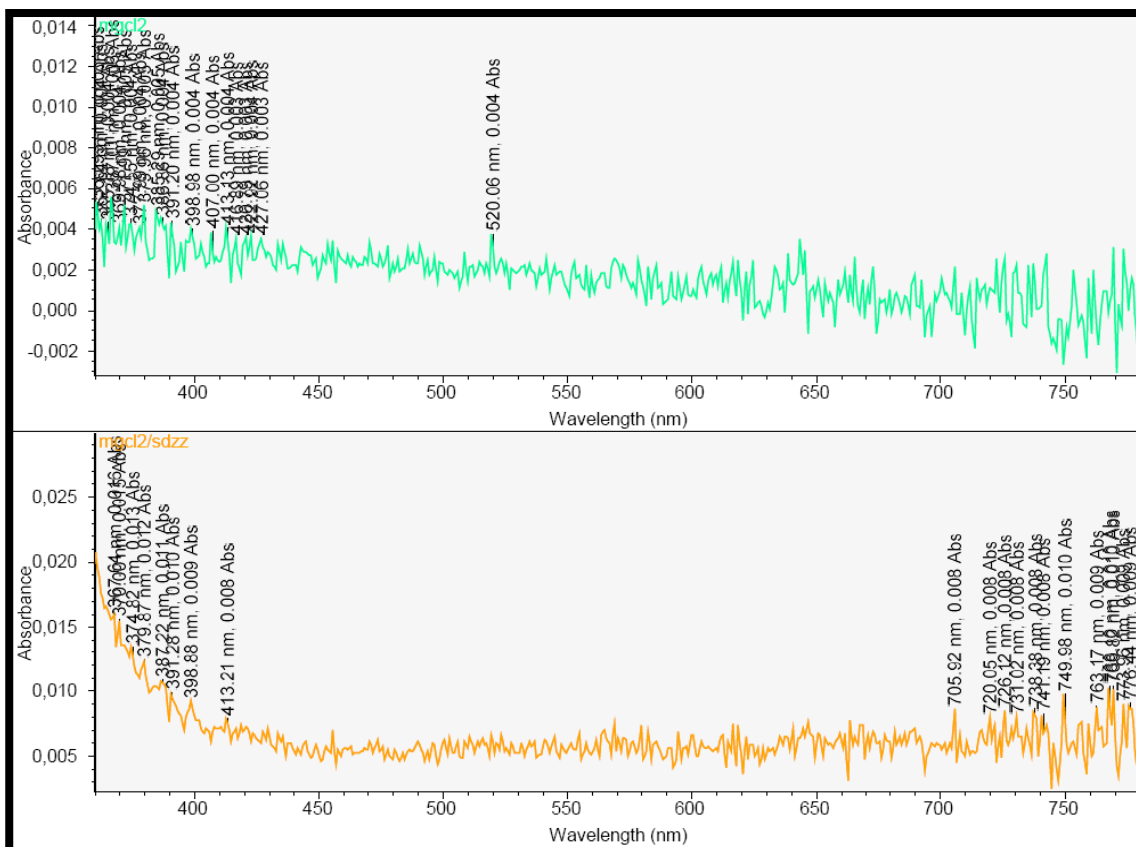
**Figura A.4** – Espectro de absorvância de nitrato de chumbo e deste com SDZ



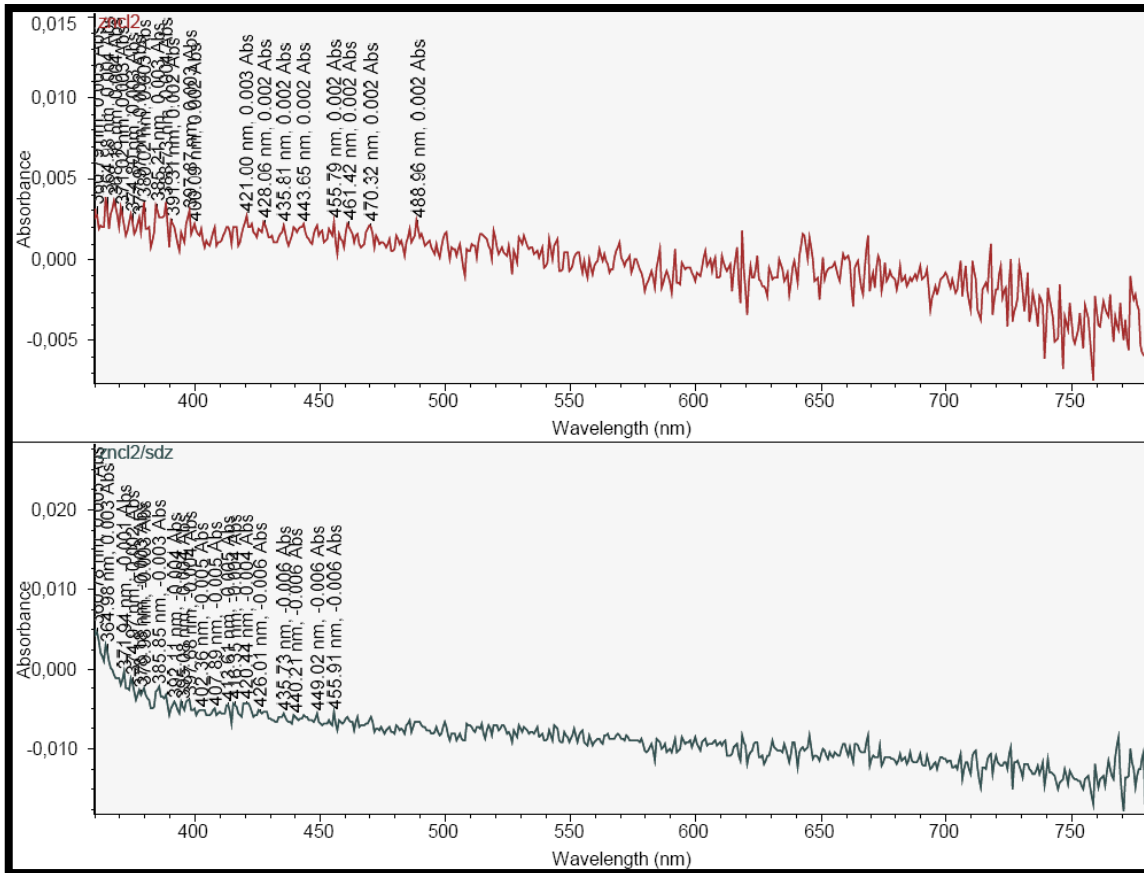
**Figura A.5** – Espectro de absorvância de sulfato de cobre e deste com SDZ



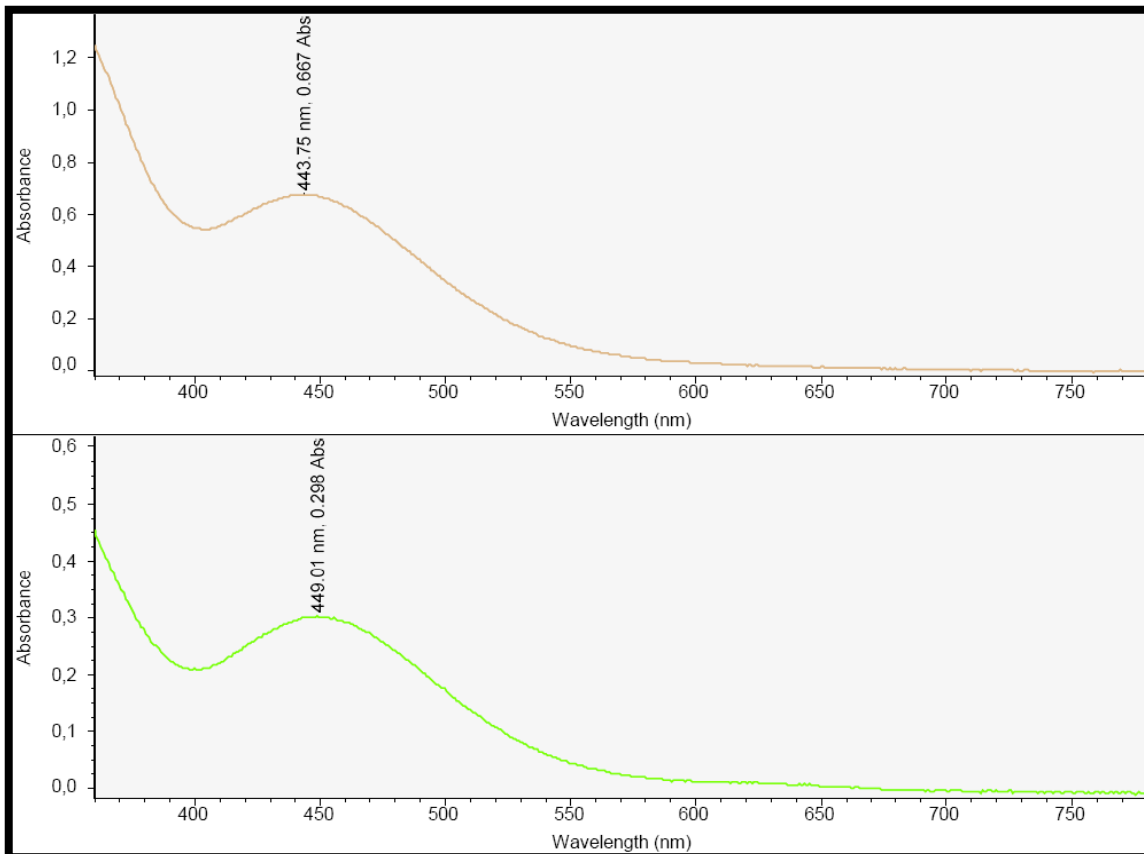
**Figura A.6** – Espectro de absorvância de sulfato de alumínio e deste com SDZ



**Figura A.7** – Espectro de absorvância de cloreto de magnésio e deste com SDZ



**Figura A.8 –** Espectro de absorvância de cloreto de zinco e deste com SDZ

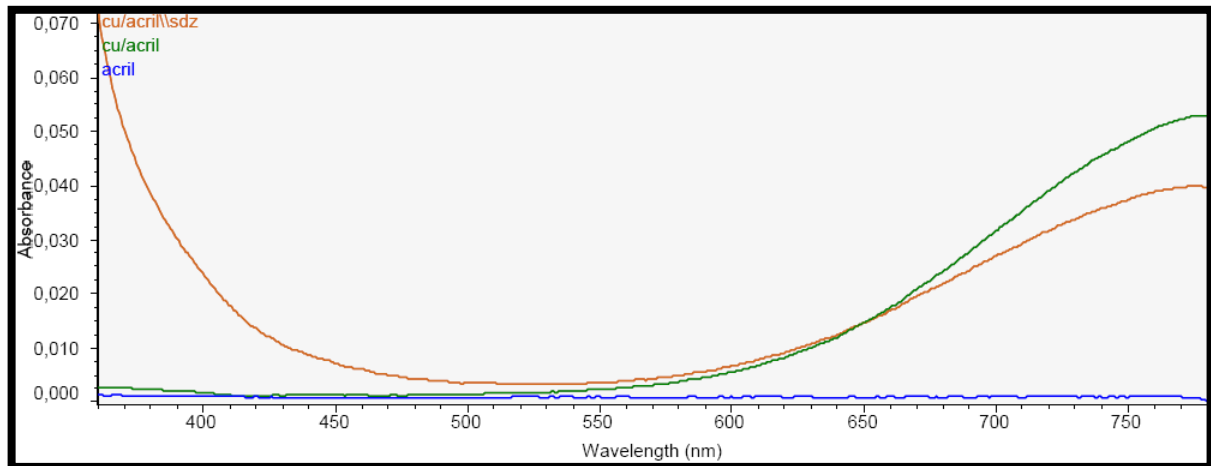


**Figura A.9 –** Espectro de absorvância de Iodo e deste com SDZ

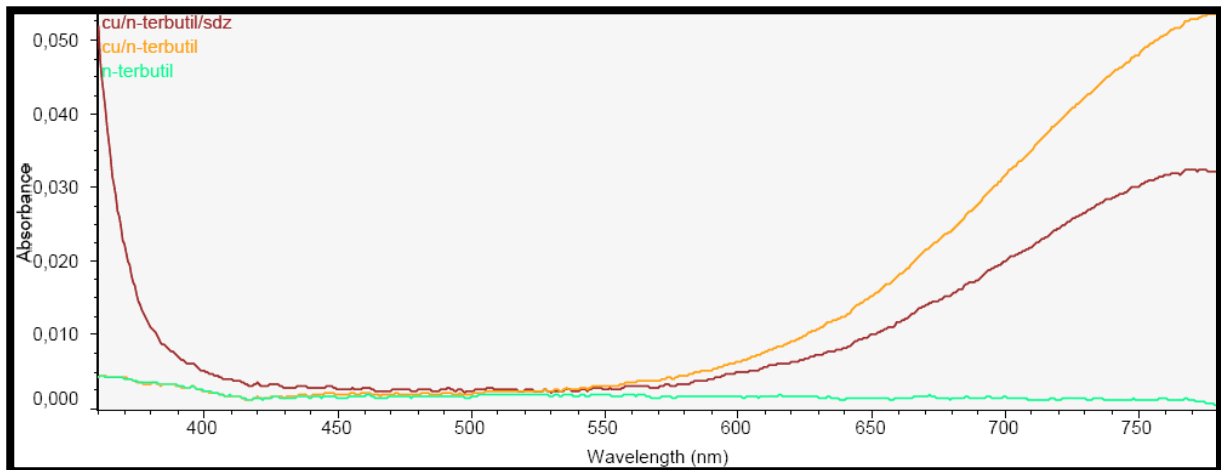




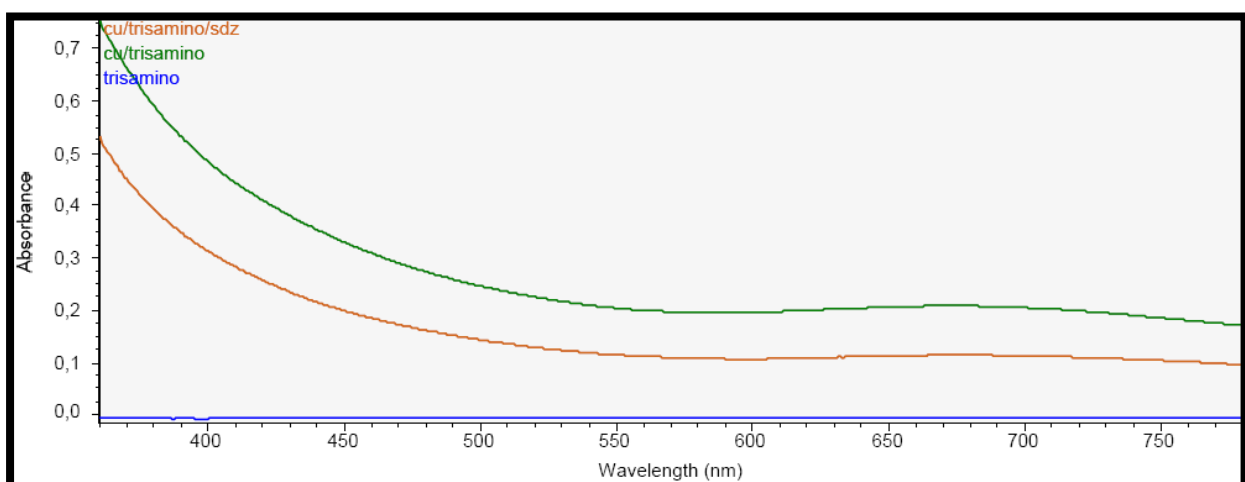
## **Anexo B.** ***Agentes complexantes orgânicos***



**Figura B.1** – Espectro de absorvância de acrilamida, desta com o cobre e com a SDZ



**Figura B.2** – Espectro de absorvância de N-ter-butil-acrilamida, deste com o cobre e com a SDZ



**Figura B.3** – Espectro de absorvância de tris(hidroxi metil)aminometano, deste com o cobre e com a SDZ

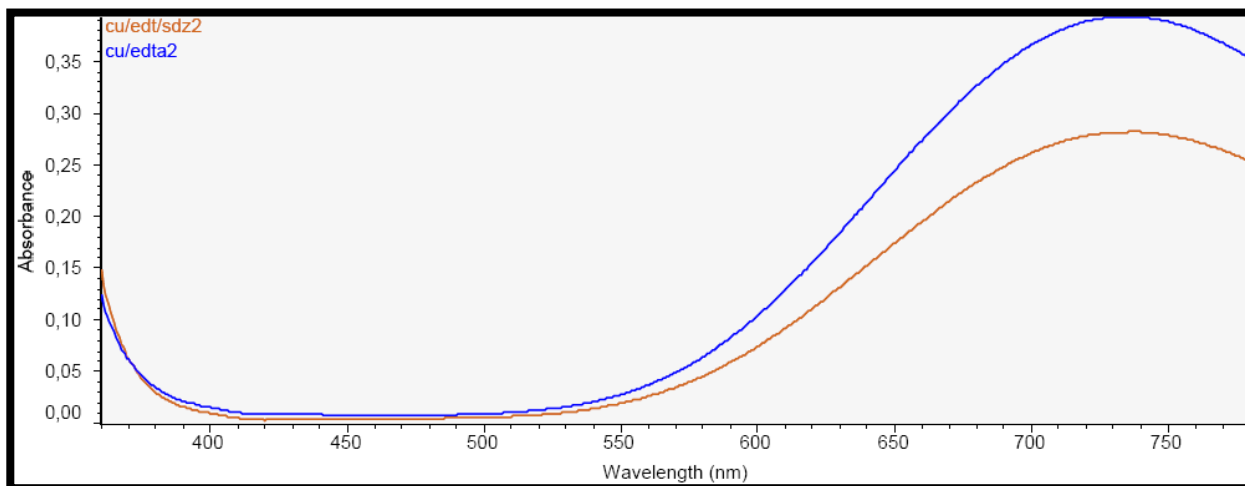


Figura B.4 – Espectro de absorvância de EDTA, deste com o cobre e com a SDZ

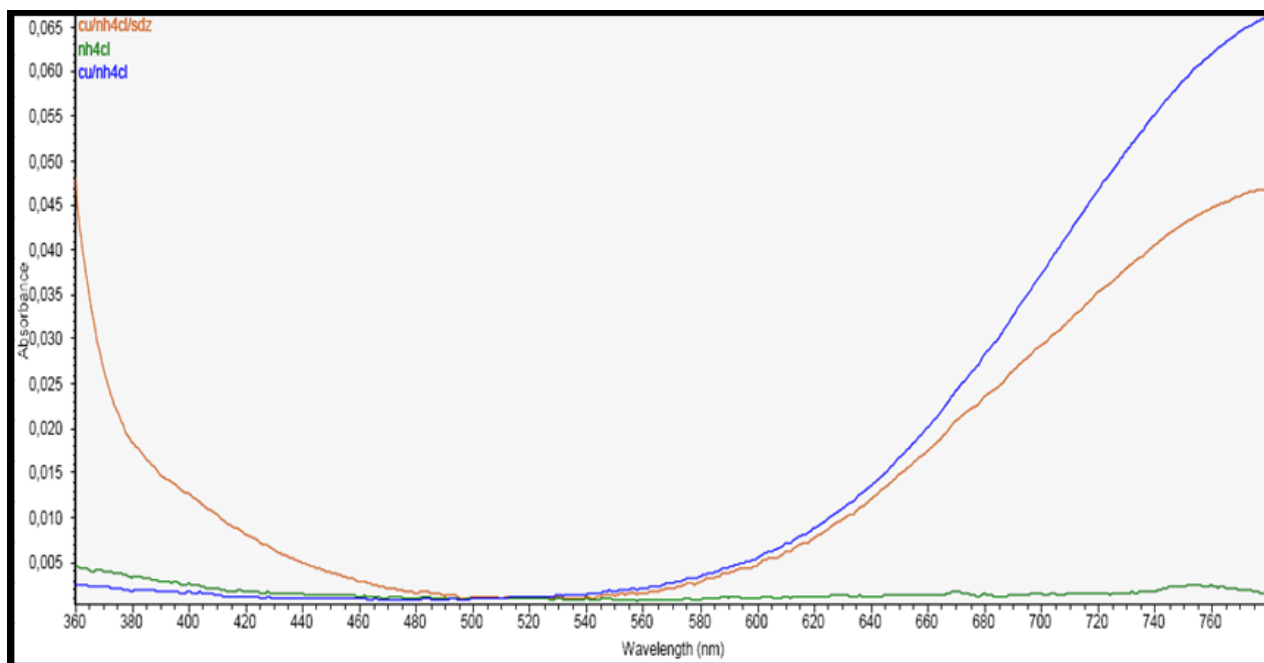
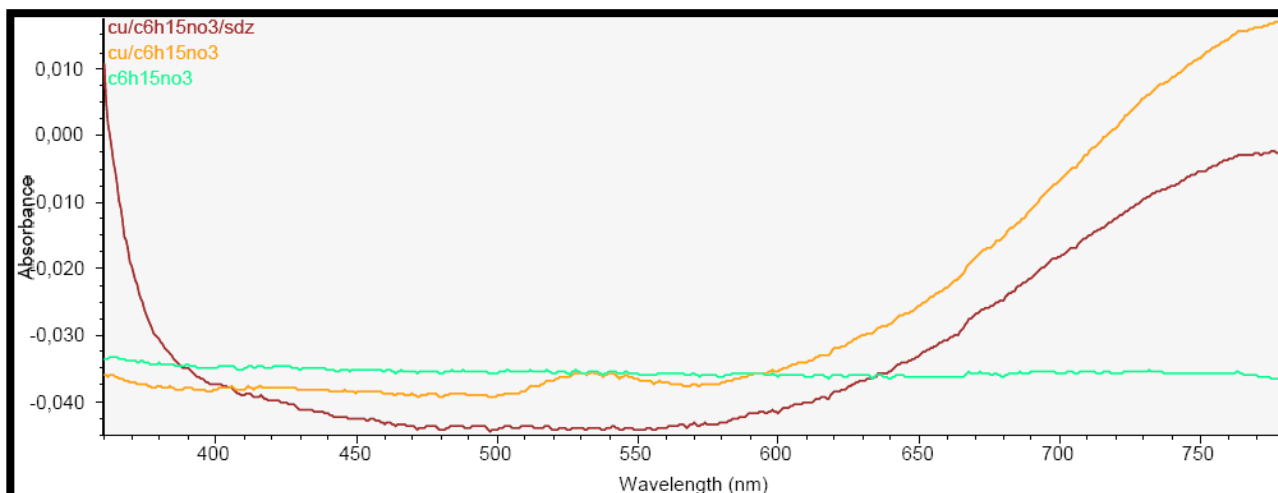
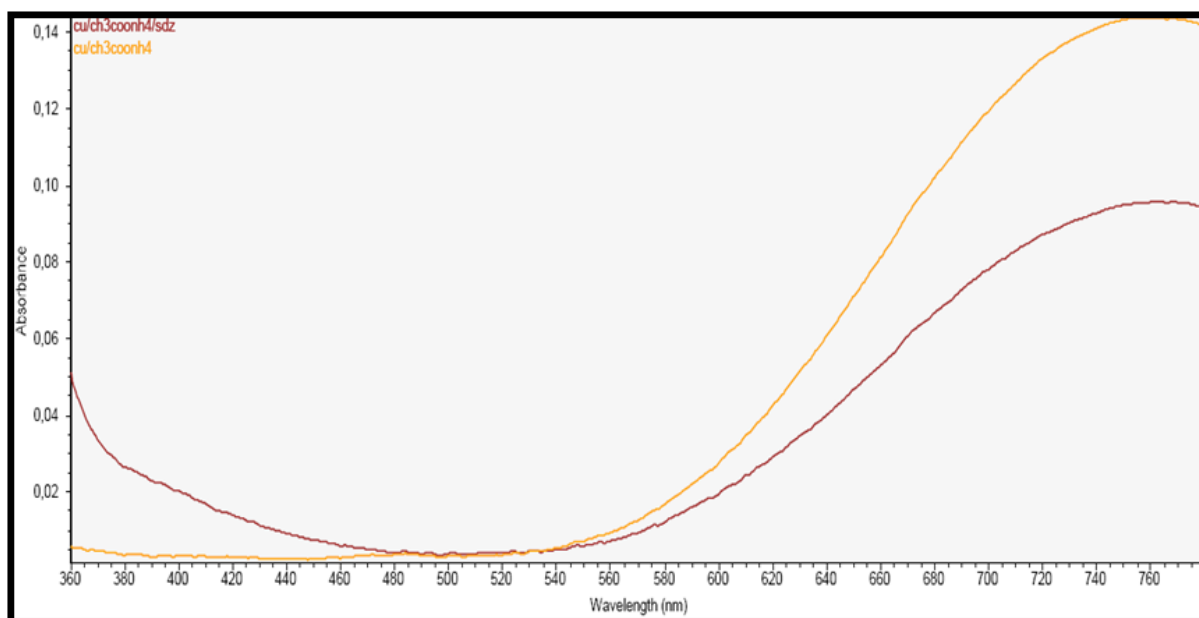


Figura B.5 – Espectro de absorvância de cloreto de amônio, deste com o cobre e com a SDZ



**Figura B.6** – Espectro de absorvância de cloridrato de trietanolamina, desta com o cobre e com SDZ

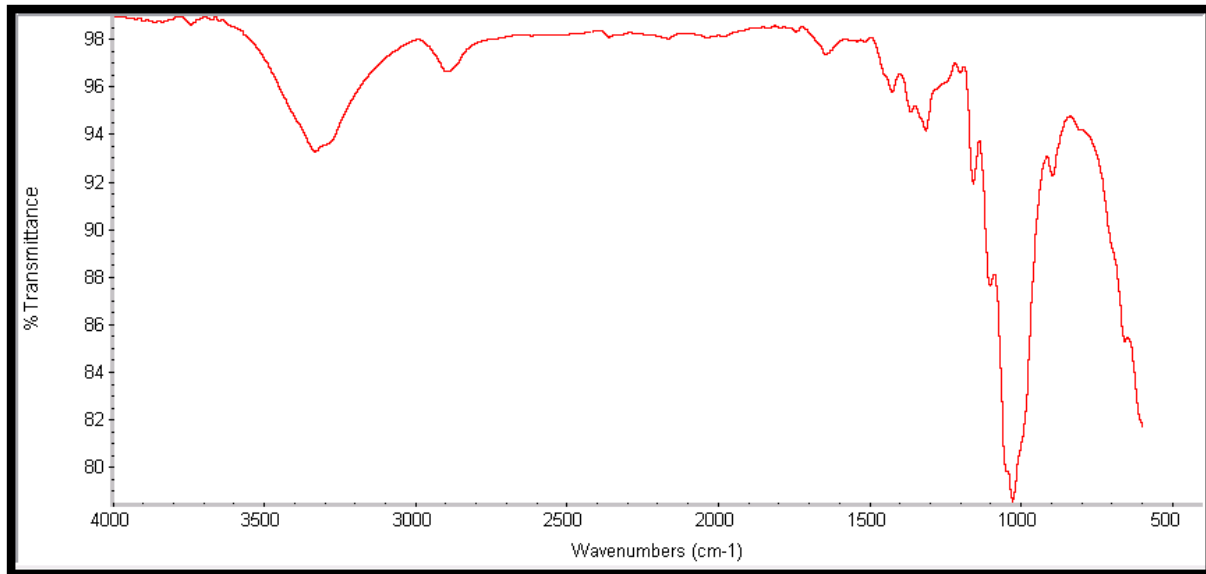


**Figura B.7** – Espectro de absorvância de acetato de amónio, deste com o cobre e com SDZ

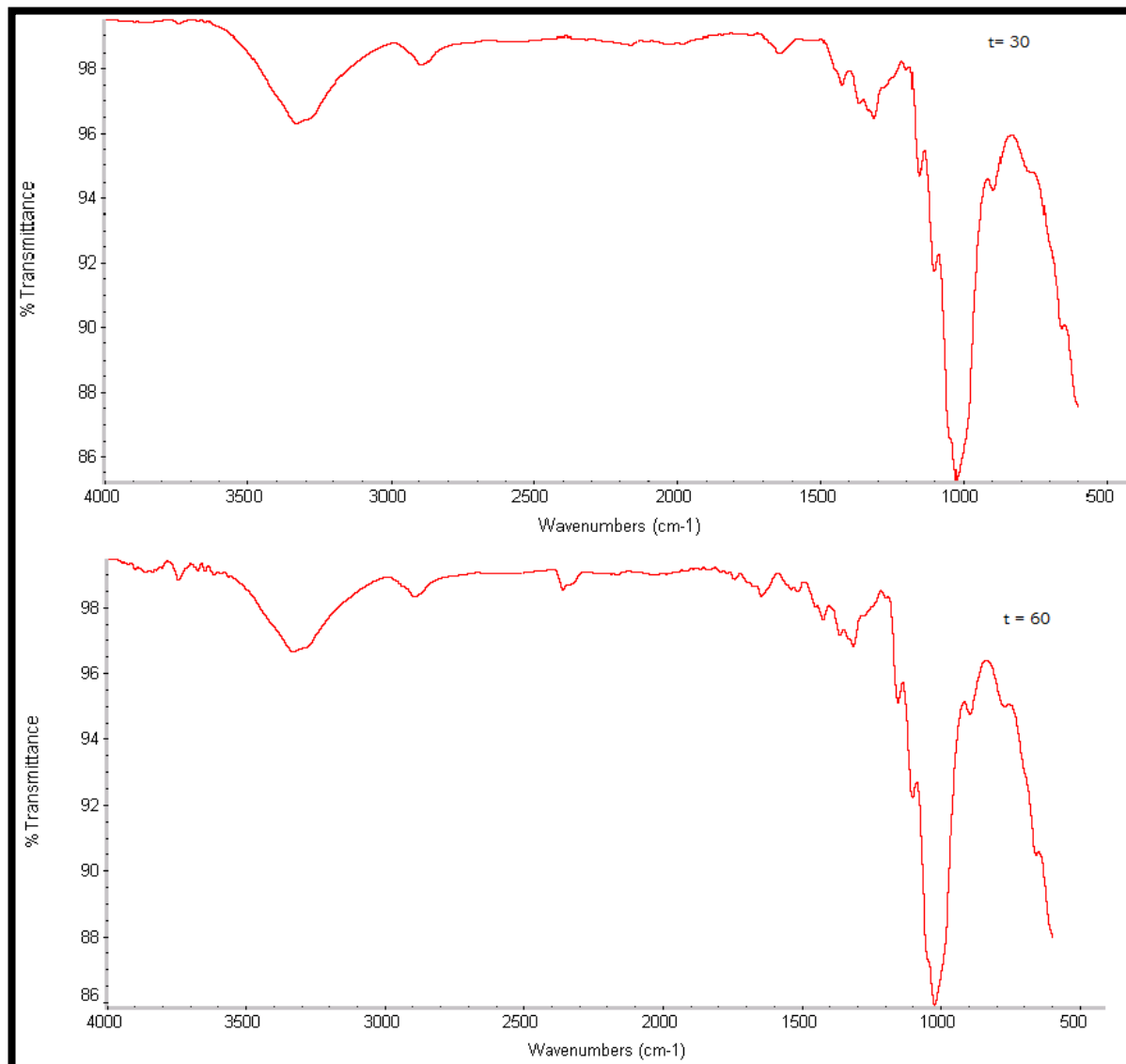


## **Anexo C.**

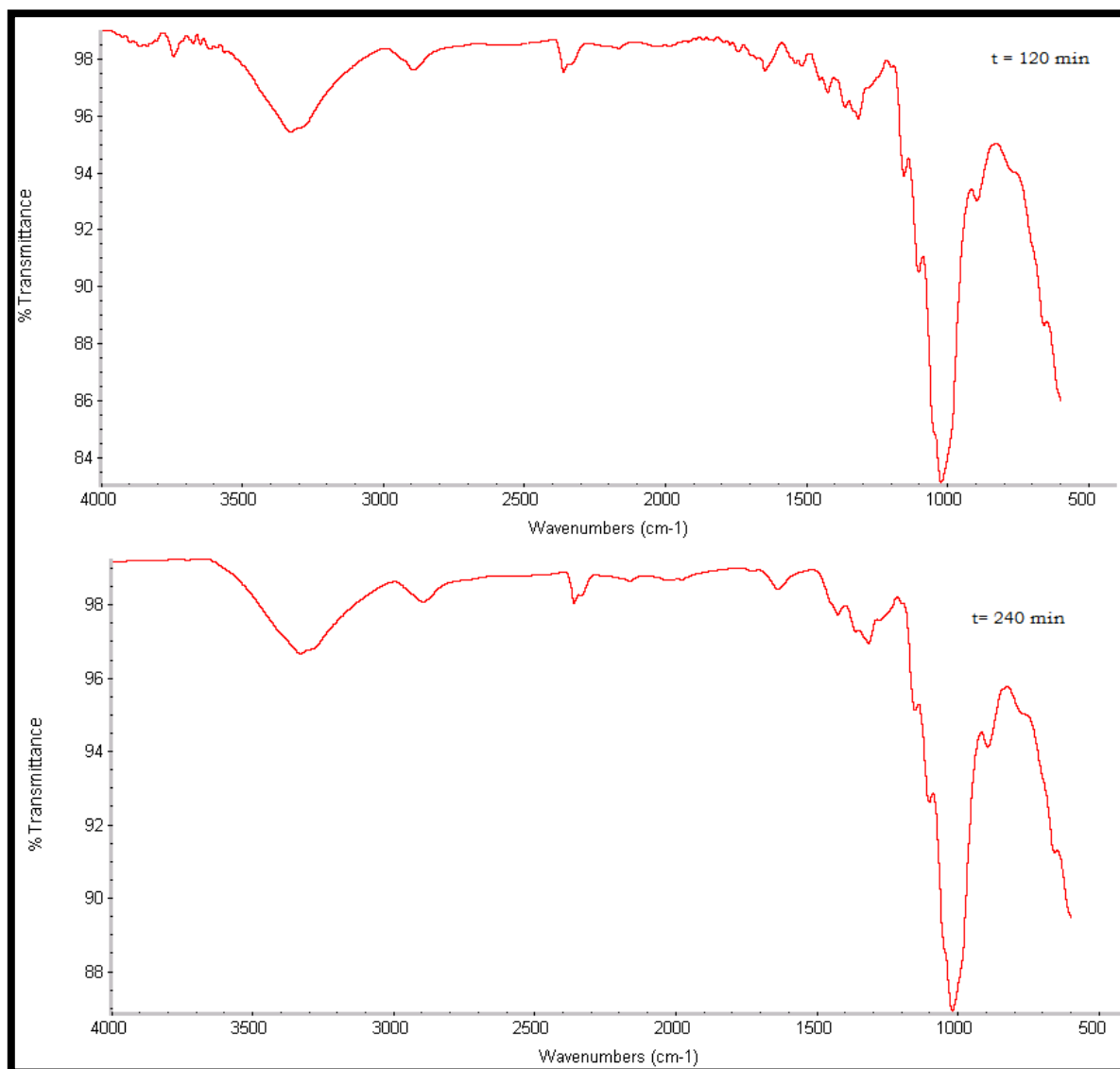
*Procedimentos de modificação química do papel*



**Figura C.1** – Espectro do papel sem modificação química



**Figura C.2** – Espectro do papel modificado à temperatura ambiente ao fim de 30 e 60 min



**Figura C.3** – Espetro do papel modificado à temperatura ambiente ao fim de 120 e 240 min

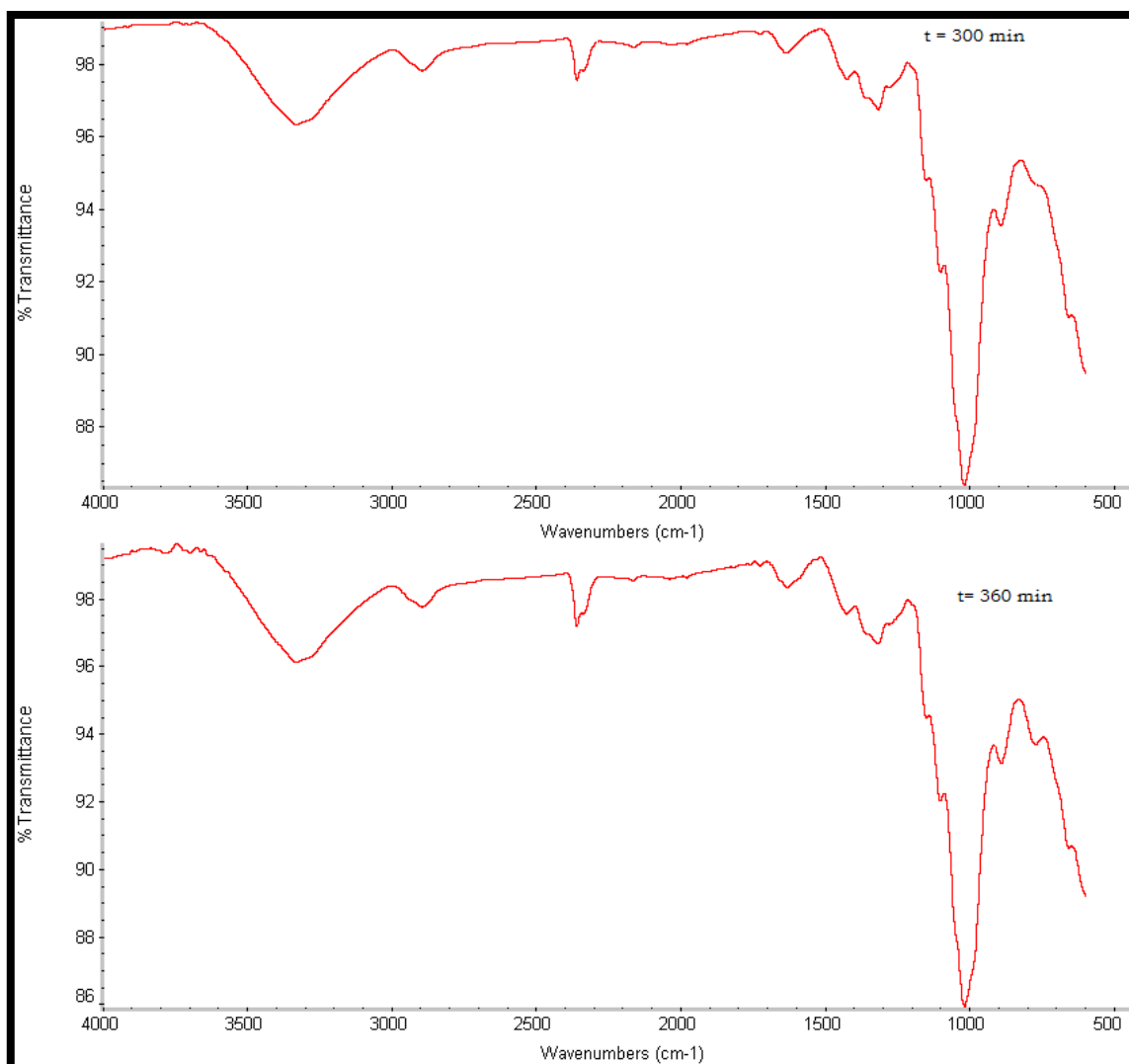
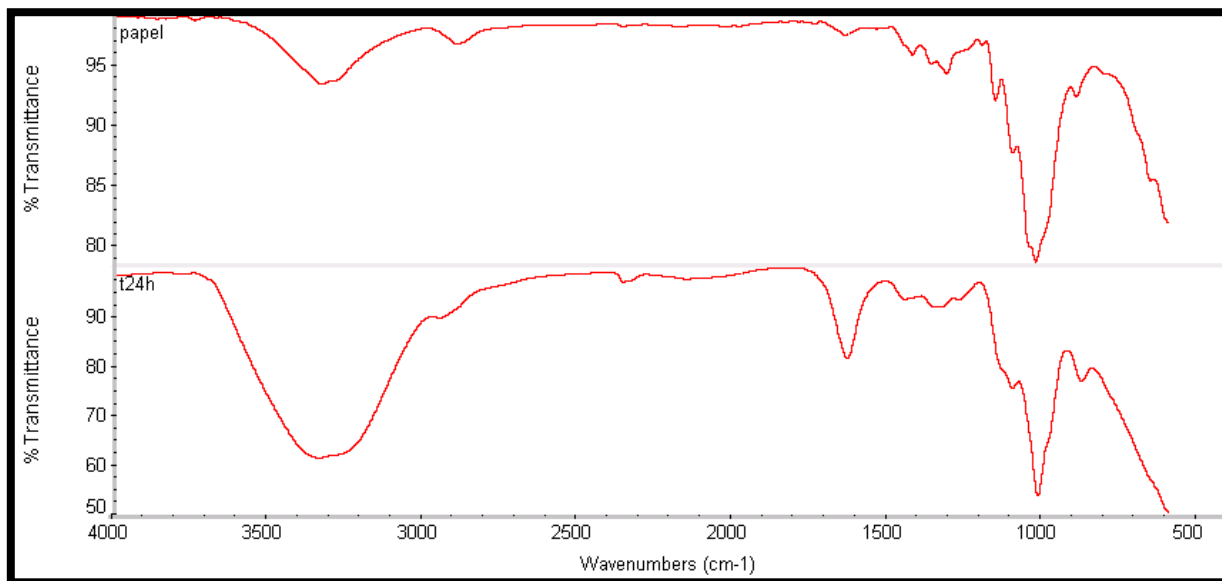
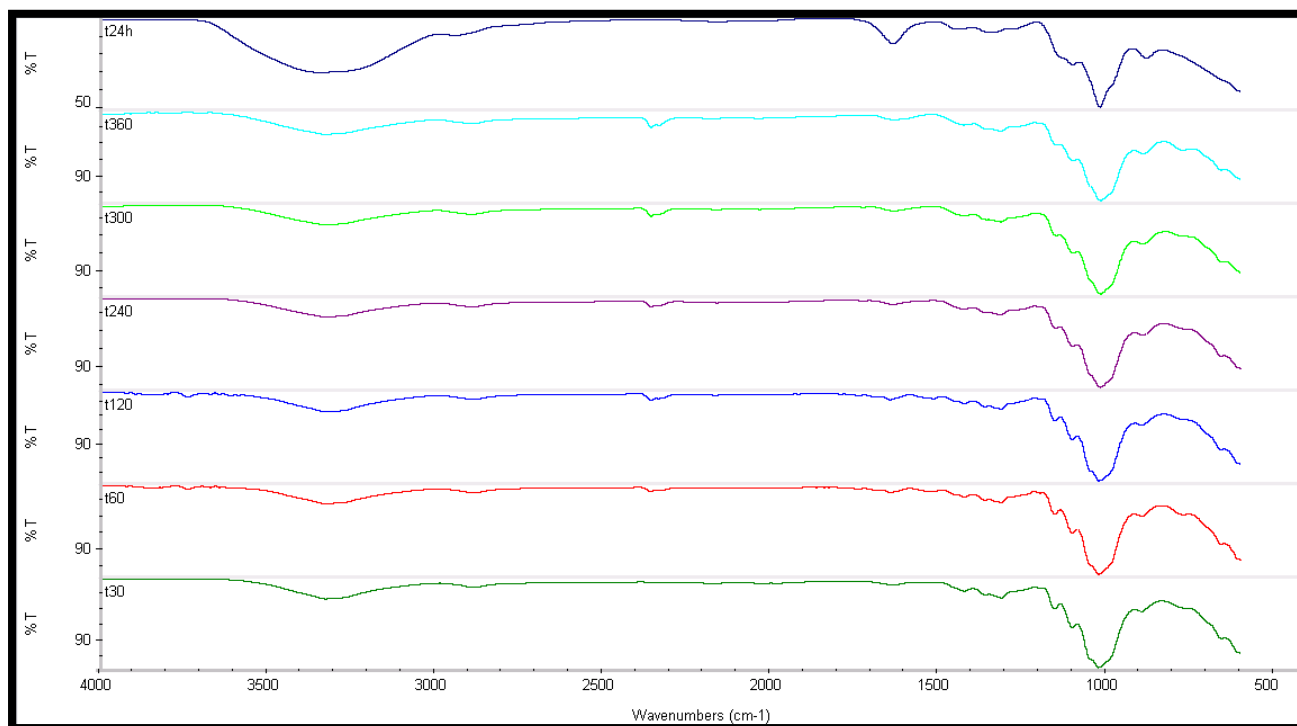


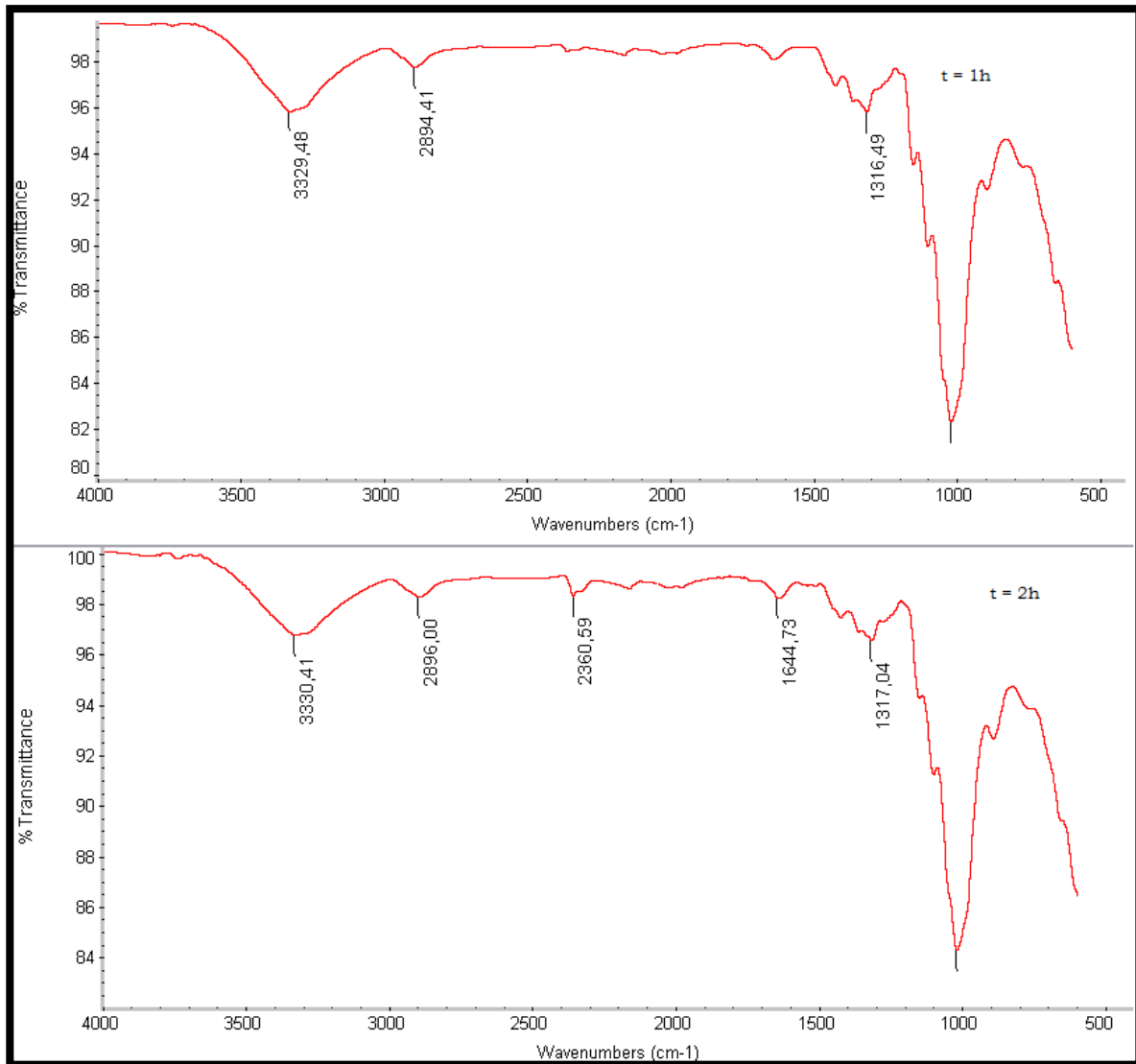
Figura C.4 – Espectro do papel modificado à temperatura ambiente ao fim de 300 e 360 min



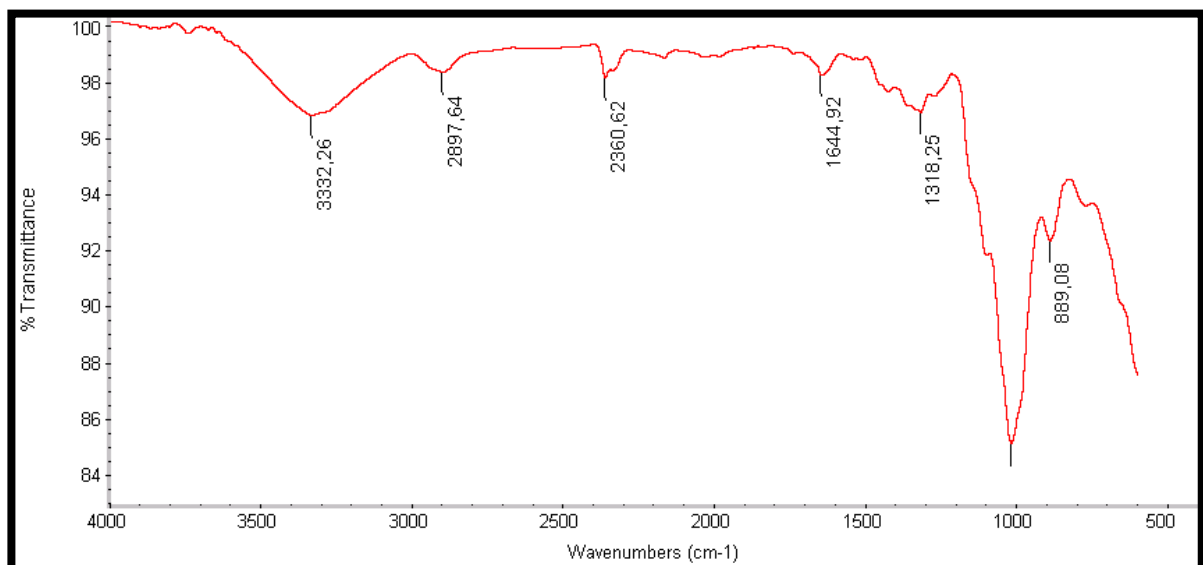
**Figura C.5** – comparação dos espectros do papel sem modificação e do papel modificado ao fim de 24h



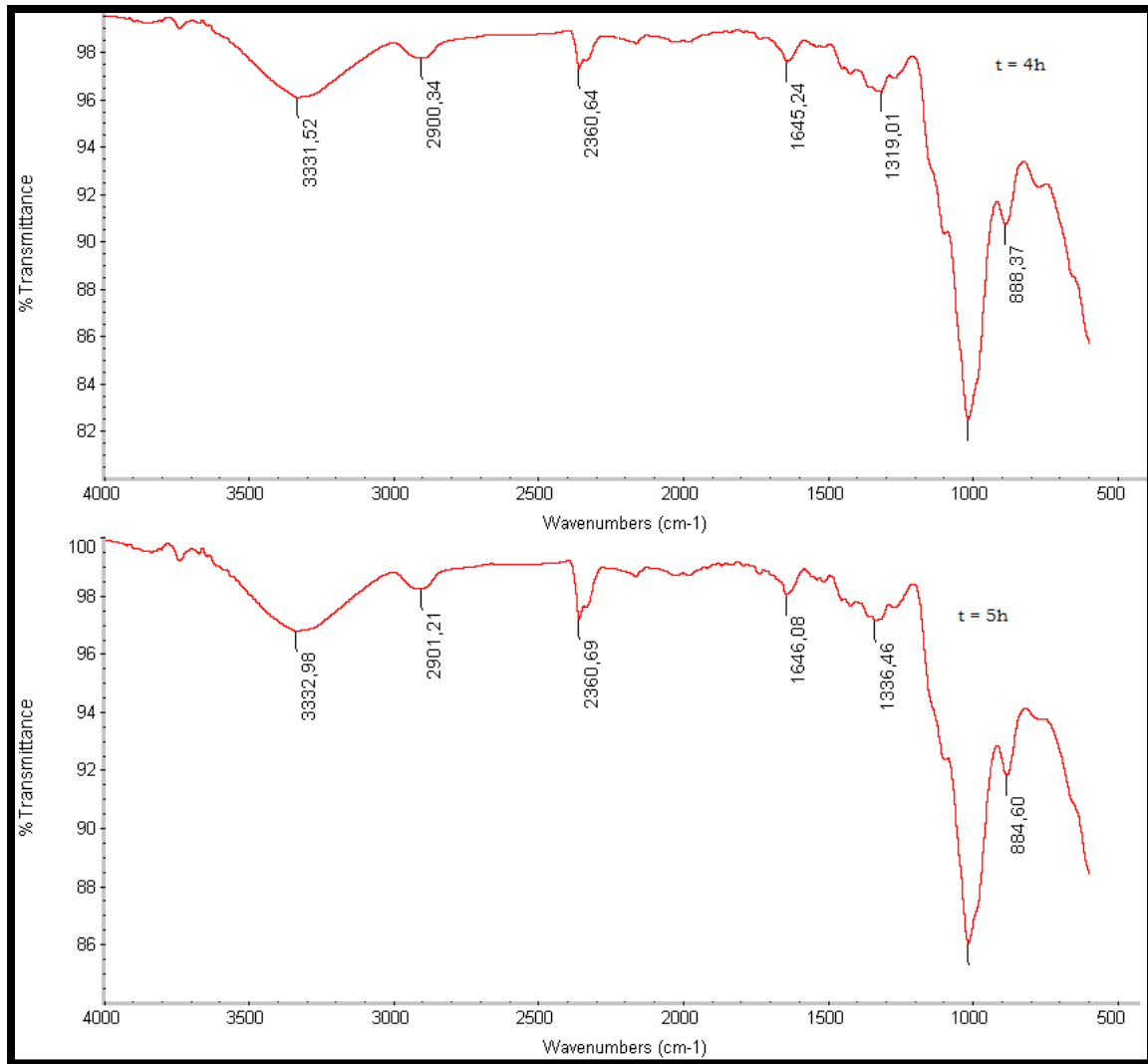
**Figura C.6** – Espectro do papel modificado à temperatura ambiente



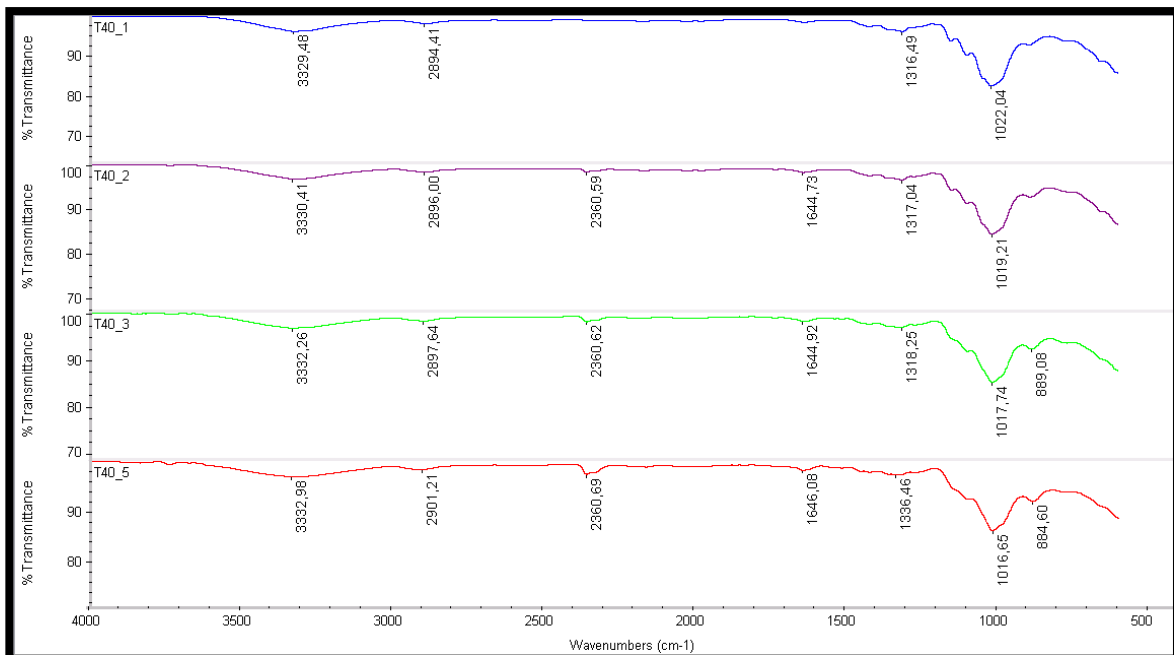
**Figura C.7** – Espectro do papel modificado à temperatura de 40 °C ao fim de 1 e 2 h



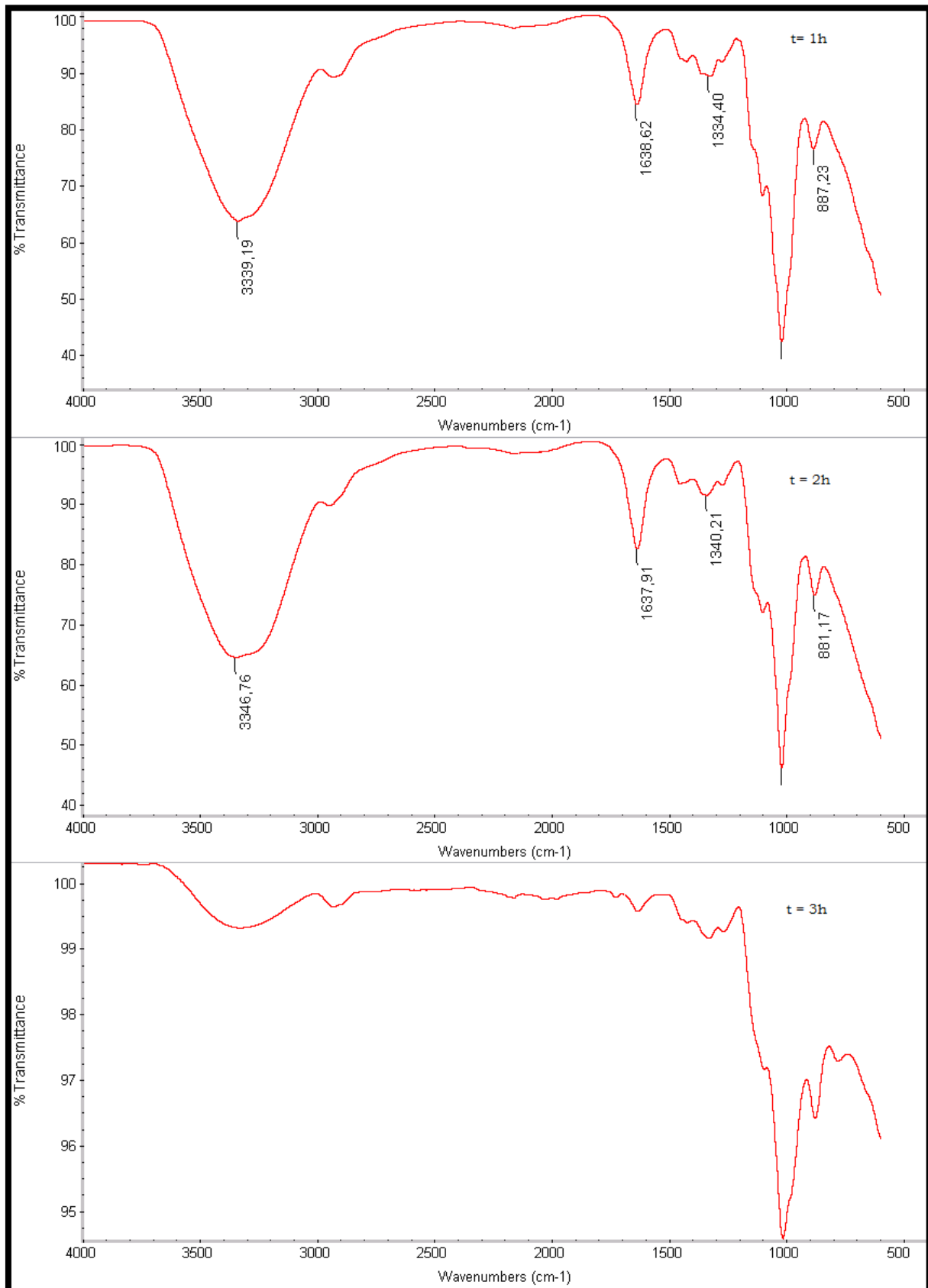
**Figura C.8** – Espectro do papel modificado à temperatura de 40 °C ao fim de 3 h



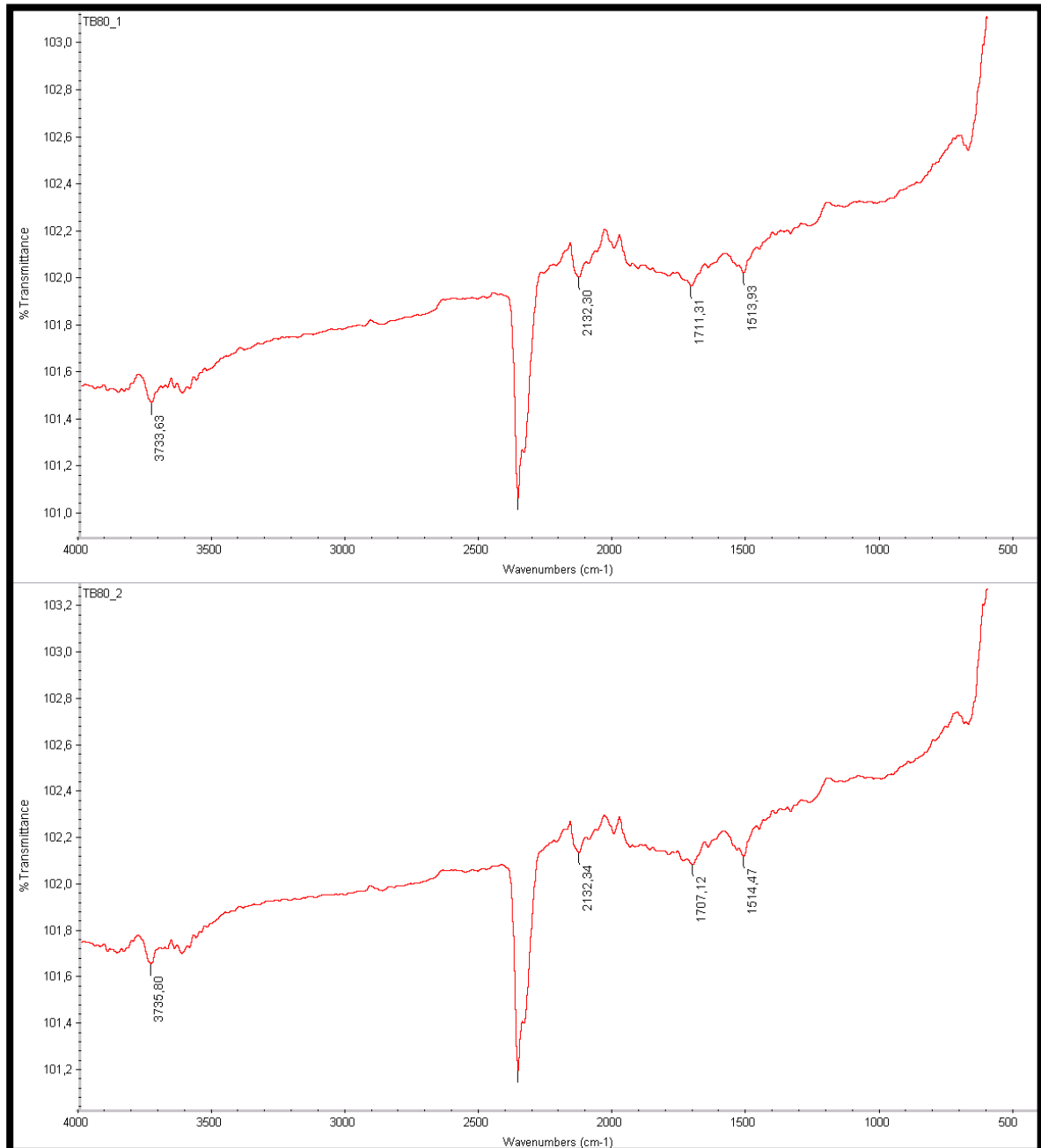
**Figura C.9** – Espectro do papel modificado à temperatura de 40 °C ao fim de 4 e 5 h



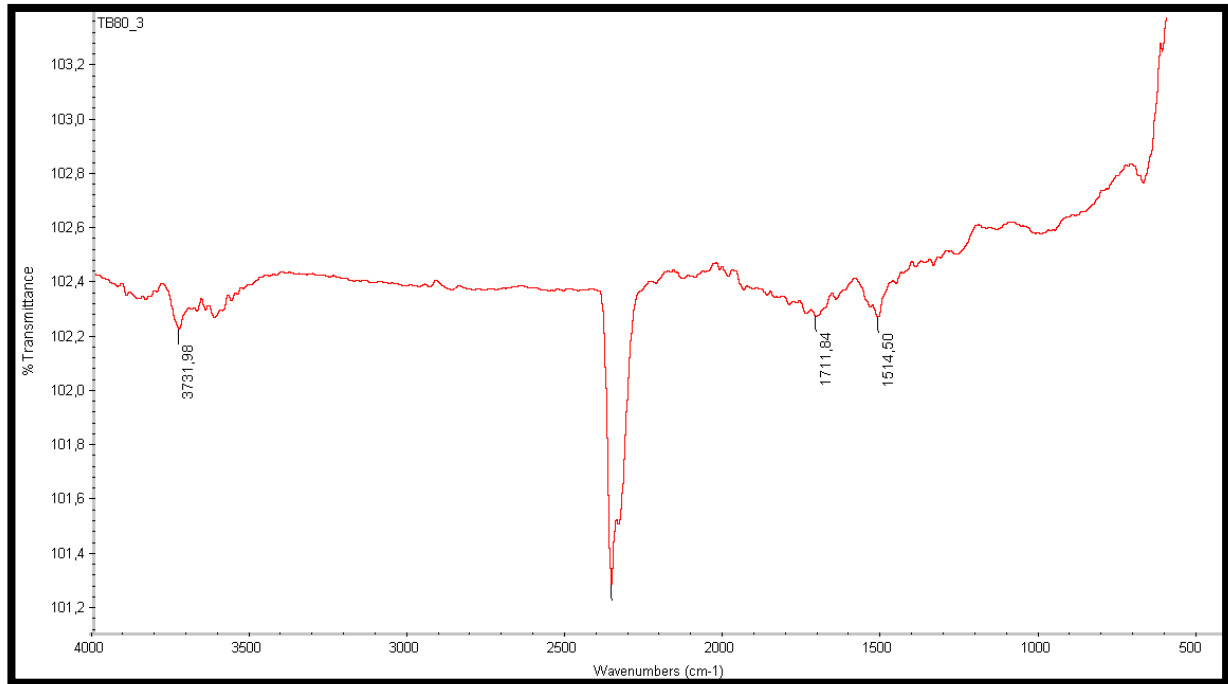
**Figura C.10** - Espectro do papel modificado à temperatura de 40 °C



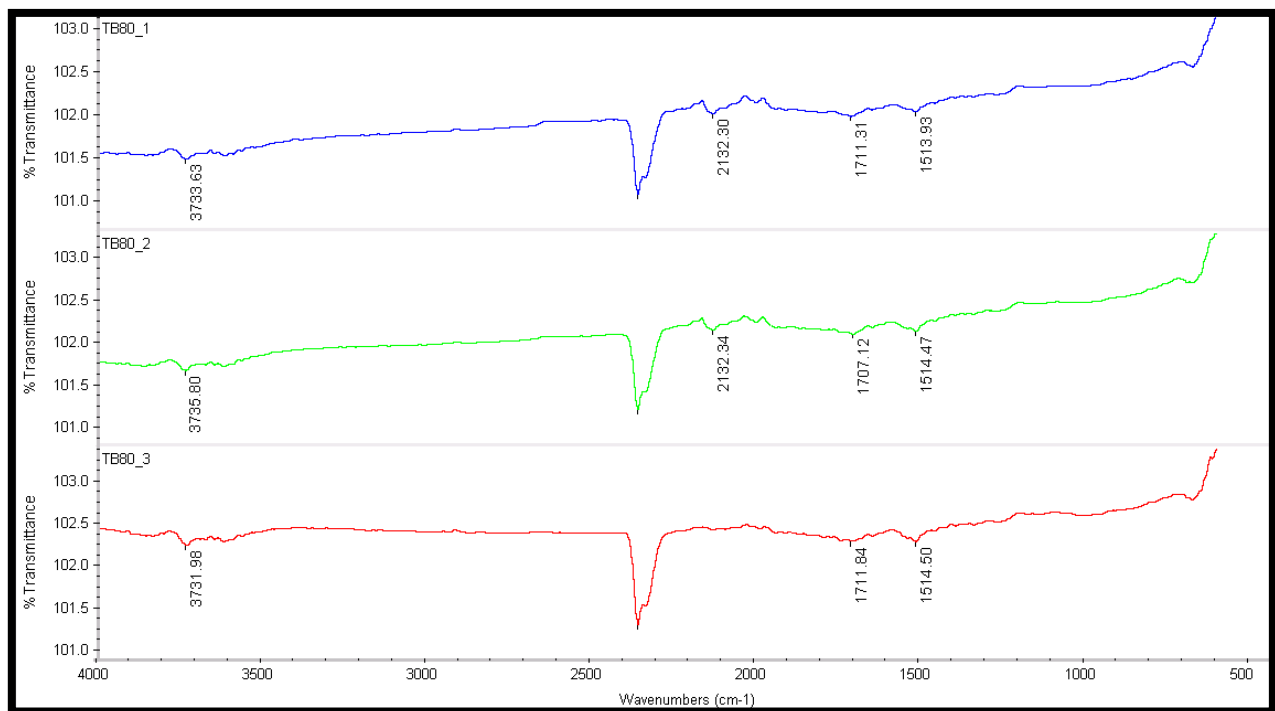
**Figura C.11** – Espetro do papel modificado à temperatura de 60 °C ao fim de 1, 2 e 3h



**Figura C.12** – Espetro do papel modificado à temperatura de 80 °C ao fim de 1, 2h



**Figura C.13** – Espectro do papel modificado à temperatura de 80 °C ao fim de 3h



**Figura C.14** – Espectro do papel modificado à temperatura de 80 °C



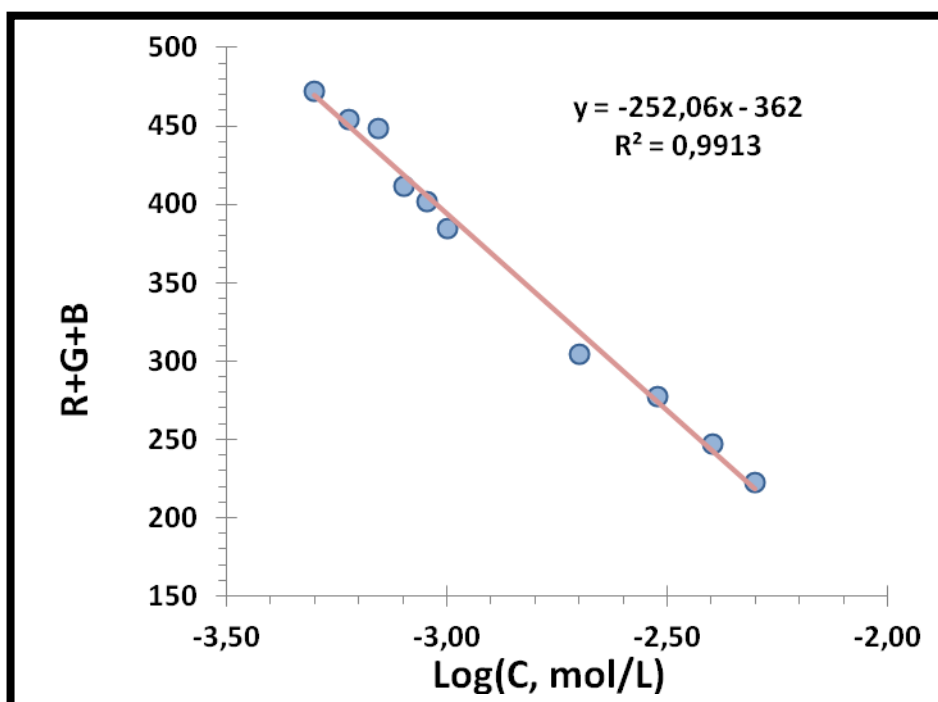
## **Anexo D.** ***Curva de Calibração***

**Tabela D.1** – coordenadas RGB das soluções padrão e o respetivo logaritmo da concentração

C (M)	R	G	B	R+G+B	LogC
5,00E-03	97,0	61,0	64,5	222,50	-2,30
4,00E-03	101,5	68,5	77,0	247,00	-2,40
3,00E-03	113,0	78,0	86,0	277,00	-2,52
2,00E-03	130,5	88,5	85,5	304,50	-2,70
1,00E-03	150,5	116,0	118,0	384,50	-3,00
9,00E-04	154,0	126,5	121,5	402,00	-3,05
8,00E-04	153,5	129,5	128,5	411,50	-3,10
7,00E-04	156,0	146,0	146,5	448,50	-3,15
6,00E-04	158,5	147,5	148,5	454,50	-3,22
5,00E-04	161,5	156,5	154,5	472,50	-3,30

**Tabela D.2** – coordenadas RGB da água dopada

C(M)	R	G	B	R+G+B	LogC
3,00E-03	115,5	75,0	83,5	274,00	-2,52
9,00E-04	155,5	127,0	128,5	411,00	-3,05
7,00E-04	152,0	136,5	139,0	427,50	-3,15



**Figura D.1** – curva de calibração



**Tabela D. 3 – Análise do erro cometido**

<b>Log(C exp)</b>	<b>ConcExp</b>	<b>ConcTeo</b>	<b>Erro</b>
-2,52	2,998E-03	3,00E-03	-0,08
-3,07	8,58E-04	9,00E-04	-4,72
-3,13	7,38E-04	7,00E-04	5,37