

Imunossensor para a deteção de fármacos como contaminantes emergentes

DANIEL JORGE DOMINGUES RAMALHO

Julho de 2023

Imunossensor para a deteção de fármacos como contaminantes emergentes

Daniel Jorge Domingues Ramalho

Mestrado em Biorrecursos

Departamento de Engenharia Química

Instituto Superior de Engenharia do Porto

Julho 2023

Orientadores

Simone Morais, ISEP

Álvaro Torrinha, REQUIMTE-LAQV, ISEP

Maria Freitas, REQUIMTE-LAQV, ISEP

Dissertação Submetida como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Biorrecursos

Este estudo foi apoiado financeiramente através do projeto NATURIST 2022.07089.PTDC pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) e através de fundos nacionais.



Mestrado

Aos meus pais,
Pelo apoio extraordinário e incentivo
fornecido em todo o percurso académico.

Agradecimentos

Quero antes de mais agradecer ao Álvaro Torrinha e à Maria Freitas por todo o apoio dado durante todo o percurso, por me terem ajudado ao longo de toda esta tese de mestrado através de dicas, apreciações e comentários tanto sobre o relatório como a parte prática, orientando-me para os melhores resultados. Um grande obrigado à Prof. Simone Morais pelas dicas e correções dadas durante a realização desta tese e também pela oportunidade por me incluir e dar a possibilidade de realizar este tema num período pós-laboral, o qual tem os seus desafios acrescidos pela limitação do tempo, mas que no fundo me fez crescer como indivíduo.

Um agradecimento ao GRAQ por me ter acolhido e me ter concedido todas as condições necessárias para a realização da parte experimental. Um agradecimento à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) pela ajuda monetária para a obtenção de todo o material necessário.

Um obrigado aos meus colegas de trabalho, de universidade, e de longa data, que me deram a força necessária para acabar este meu percurso e etapa final.

Por último, e não menos importante, agradeço aos meus pais por sempre acreditarem em mim e me darem apoio psicológico sempre que necessitei. Sem eles todo este processo seria mais difícil.

Resumo

O consumo crescente de compostos farmacêuticos tem levado à libertação de inúmeros compostos não metabolizados para o meio ambiente, sobretudo através de fluidos biológicos, como a urina, ou outros compostos como fezes. Os efluentes resultantes devem ser tratados em Estação de Tratamento de Águas Residuais, porém estas instalações não têm capacidade ou infraestruturas adequadas para a remoção destes compostos. O trimetoprim (TMP) é um agente antimicrobiano e antiparasitário vastamente prescrito/administrado, existindo um elevado consumo por parte da população. Devido à sua alta prevalência em corpos aquáticos, este fármaco é considerado um poluente emergente. Deste modo, torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos inovadores para a análise e detecção de TMP, os quais devem ter características vantajosas comparativamente aos métodos tradicionalmente usados. Os biossensores são uma alternativa atrativa devido à sua rápida resposta, fácil miniaturização e portabilidade.

Neste trabalho foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico para análise de TMP em amostras alimentares provenientes do meio aquático. Procedeu-se à construção de um sistema eletroquímico que contempla uma célula eletroquímica de tamanho reduzido, um eletrodo de trabalho de papel de fibra de carbono (CP) e um eletrodo de carbono vítreo (GCE) utilizado como eletrodo de referência acoplado ao eletrodo auxiliar. Este sistema permitiu o uso de um volume de eletrólito reduzido relativamente menor comparativamente aos sistemas convencionais. Para a construção do imunossensor, imobilizou-se 10 µL de anticorpo anti-TMP policlonal (concentração de 100 µg/mL), durante 20 minutos. Seguiu-se a adição de TMP à célula eletroquímica (método de adição padrão), sendo efetuada a medição em 5 mL de solução tampão PBS, utilizando como técnica a voltametria de onda quadrada (SWV). As características analíticas do imunoensaio foram avaliadas numa gama de concentrações entre 0,5 µM a 3,5 µM, verificando-se a linearidade entre 1,2 µM e 2,8 µM. Os limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ, respetivamente) foram calculados, obtendo-se um LOD de 0,25 µM e um LOQ de 0,84 µM.

Após a validação do imunossensor, foram analisadas amostras alimentares de bacalhau. Foi efetuado o estudo de recuperação após fortificação das amostras previamente tratadas de acordo com um procedimento estabelecido para o TMP e obtiveram-se recuperações entre 88 e 113%.

O biossensor desenvolvido demonstrou resultados promissores para a análise de TMP em peixes. Apesar de serem necessárias melhorias adicionais, este método demonstra ter potencial para o desenvolvimento de um imunossensor capaz de efetuar a detecção rápida, eficaz e utilizando um sistema de tamanho reduzido comparativamente aos tradicionalmente empregues.

Palavras-Chave: TMP, poluentes emergentes, imunossensor; eletroquímico; CP; SWV; amostras alimentares

Abstract

The rising of pharmaceutical compounds consumption has led to the release of many non-metabolized compounds to the environment, mainly through biological fluids, like urine or even other compounds like feces. The resulting effluents must be treated in Wastewater Treatment Plants, although, these facilities do not have the capacity or suitable infrastructures capable of removing these compounds. TMP is an antimicrobial and antiparasitic agent that is commonly administrated. Given this, its prevalence is already high on water bodies due to the high consumption by the population, being then considered an emergent pollutant. It is then imperative the development of innovative analytical methods for the detection and analysis of this drug, which must have advantageous characteristics compared to those traditionally used. The biosensors are an attractive alternative due to their fast response, easy miniaturization, and portability.

This work consisted of the development of an electrochemical immunosensor for the TMP analysis in food samples, using the Square Wave Voltammetry technique. A reduced size electrochemical cell was used with a system consisting of a carbon paper electrode and a glassy carbon electrode as the reference electrode coupled as auxiliary electrode. This system allowed the use of a relatively reduced electrolyte volume compared to those traditionally used. For the immunosensor construction, 10 μL of anti-TMP polyclonal antibody were immobilized (100 $\mu\text{g/mL}$ concentration), for 20 minutes. Then, the TMP administration took place by the standard addition method, assessing a concentration range between 0,5 μM and 3,5 μM , which resulted in a linearity between 1,2 μM and 2,8 μM . It was then calculated the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), being these 0,25 μM and 0,84 μM , respectively.

After the immunosensor validation, cod samples were analyzed. A recovery assessment after fortification of the samples was performed according to the established procedure for the TMP, and recoveries between 88 and 113% were obtained.

The biosensor showed promising results for the TMP analysis in fish. Although some additional improvements are necessary, this method demonstrates potential for the development of an immunosensor capable of performing rapid and effective detections, using a reduced size system compared to the conventionally used.

Key Words: TMP, emergent pollutants, immunosensor, electrochemical, CP, SWV, food samples

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Indústria farmacêutica e a sua evolução	1
1.1.1	Poluentes emergentes	2
1.1.1.1	Trimetoprim (TMP)	3
1.1.2	Legislação	5
1.1.3	Técnicas tradicionais para a deteção de poluentes emergentes.....	6
1.2	Biossensores	8
1.3	Eletroquímica.....	13
1.3.1	Métodos amperométricos.....	14
1.3.1.1	Cronoamperometria.....	14
1.3.1.2	Voltametria cíclica (CV)	15
1.3.1.3	Voltametria de onda quadrada	17
1.3.1.4	Voltametria de pulso diferencial	18
1.3.1.5	Voltametria de varrimento linear	19
1.3.2	Instrumentação usada em sensores eletroquímicos.....	20
1.4	Nanomateriais.....	23
1.4.1	Nanomateriais à base de carbono	25
1.4.1.1	Nanotubos.....	25
1.4.1.2	Grafeno.....	26
1.4.1.3	QDs	28
1.4.2	Nanomateriais metálicos	29
1.4.2.1	Nanopartículas de ouro	29
1.4.2.2	Óxidos metálicos	30
1.4.3	Outros nanomateriais e aplicações.....	32
1.5	Objetivos	34
2	Procedimento experimental.....	35
2.1	Reagentes, equipamentos e soluções	35
2.2	Eléttodos e sistema eletroquímico.....	35
2.2.1	Seleção do eléctrodo de trabalho.....	36
2.2.2	Miniaturização da célula eletroquímica	37
2.3	Construção do imunoensaio e deteção eletroquímica	37
2.4	Preparação das amostras alimentares.....	38

3	Resultados e Discussão.....	39
3.1	Seleção do eletrodo de trabalho.....	39
3.2	Construção e otimização do sistema eletroquímico.....	41
3.2.1	Análise de TMP utilizando sistema de 3 eletrodos dispostos individualmente	42
3.2.2	Análise de TMP utilizando sistema de 2 eletrodos dispostos individualmente	42
3.3	Otimização do imunoensaio.....	43
3.3.1	Efeito da concentração vs. tempo de incubação de anticorpo	43
3.3.2	Efeito do volume de anticorpo na incubação	45
3.4	Características analíticas do imunossensor.....	47
3.5	Estudo da recuperação e avaliação do efeito matriz	49
4	Conclusões e perspectivas futuras	50
5	Referências bibliográficas.....	52
Anexos		59
Anexo A.	Resultados dos diferentes eletrodos usando SWV	59
A.1.	Eletrodo de carbono vítreo	59
A.2.	Eletrodos de papel de fibra de carbono	60
A.3.	Eletrodo de mina de grafite	60
A.4.	Eletrodo de grafite pirolítica	61
A.5.	Eletrodo de diamante dopado com boro	61
Anexo B.	Comparação da altura do pico do TMP para os diferentes eletrodos	62

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Os diferentes Objetivos de Desenvolvimento Sustentável impostos pela Organização das Nações Unidas (figura retirada de ODS, n.d.).....	6
Figura 1.2 - Diferentes técnicas usadas para a detecção de contaminantes emergentes ao longo das décadas e alguns exemplos usando essas mesmas técnicas (figura adaptada de Zulkifli et al., 2018).	7
Figura 1.3 - Ilustração da composição de um biossensor. Diferentes classes de transdutores, de acordo com o mecanismo de funcionamento (figura adaptada de Thakur & Kumar, 2022).	9
Figura 1.4 - Elementos que constituem um biossensor comum (figura adaptada de Grieshaber et al., 2008).	9
Figura 1.5 - Exemplo de elementos biológicos de reconhecimento (figura adaptada de Elli et al., 2022).	10
Figura 1.6 - Esquema de um imunossensor sandwich (Mitchell, 2010).	11
Figura 1.7 - Representação esquemática de um imunossensor competitivo (Mollarasouli et al., 2019)....	11
Figura 1.8 - Processo típico de oxidação-redução de uma espécie química que envolve a transferência de um eletrão (figura adaptada de Kim et al., 2020).	15
Figura 1.9 - Diferença dos voltamogramas nas convenções americana e IUPAC (figura retirada de Elgrishi et al., 2017).....	16
Figura 1.10 - Perfis de concentração de Fc^+ (azul) e Fc (verde), em função da distância do eletrodo (A-G). Voltamograma da reação (H). Potencial aplicado em função do tempo (I) (figura retirada de Elgrishi et al., 2017).....	16
Figura 1.11 - Detalhes da aplicação de potencial em voltametria de onda quadrada e definição de parâmetros (Simões & Xavier, 2017).....	17
Figura 1.12 - Forma em onda da aplicação de determinada voltagem usando voltametria de pulso diferencial (as setas vermelhas indicam o início e fim de cada passo, onde as correntes são medidas) (figura adaptada de Venton & DiScenza, 2020).....	18
Figura 1.13 - Voltamograma típico obtido usando voltametria de pulso diferencial (figura adaptada de Deffo et al., 2023).....	18
Figura 1.14 - Forma das ondas para a voltametria de varrimento linear (a) e voltametria cíclica (b) e respetivos voltamogramas (Bontempelli & Toniolo, 2009).	19
Figura 1.15 - Esquema de uma célula eletroquímica usada para determinações eletroquímicas (figura adaptada de Elgrishi et al., 2017).	20
Figura 1.16 - Áreas de intervenção da nanotecnologia (figura adaptada de Singh et al., 2020).	23
Figura 1.17 - Estrutura de nanotubos de carbono de camada múltipla (a) e de camada única (b) (figura retirada de Maruyama, 2021).	25
Figura 1.18 - Voltamogramas obtidos em parâmetros otimizados para os seguintes eletrodos: (a) parafina/nanotubos de carbono de múltiplas camadas com nanopartículas de antimónio; (b) parafina/nanotubos de carbono de múltiplas camadas; (c) eletrodo de carbono vítreo; (d) parafina/grafite (figura retirada de Cesarino et al., 2013).	26
Figura 1.19 - Esquema de preparação de $(\text{NG/CS})_{3.5}/\text{GCE}$ (figura adaptada de Yu et al., 2016).	27
Figura 1.20 - Resultados obtidos usando voltametria de pulso diferencial para uma solução de 3 mg/L de hexaclorobenzeno usando um (a) GCE não modificado; (b) $(\text{G/CS})_{3.5}/\text{GCE}$; e (c) $(\text{NG/CS})_{3.5}/\text{GCE}$ (figura adaptada de Yu et al., 2016).	28
Figura 1.21 - Efeito dos Quantum Dots na resposta eletroquímica. QDs = Quantum Dots; P6LC = negro de carbono; GCE = eletrodo de carbono vítreo. (Figura adaptada de Wong et al., 2020).....	29

Figura 1.22 – Voltametrias cíclicas obtidas para diferentes elétrodo em solução de glucose com concentrações entre 0,1 e 0,3 mM (figura adaptada de Ahmad et al., 2017).	31
Figura 1.23 – Ilustração esquemática sobre o funcionamento de detecção de glucose do biossensor não-enzimático (figura adapta de Ahmad et al., 2017).....	31
Figura 2.1 - Diferentes elétrodo testados (1 – Grafite pirolítica, 2 – Carbono vítreo, 3 – Mina de grafite, 4 – Diamante dopado com boro, 5 – Papel de fibra de carbono).	36
Figura 2.2 - Miniaturização da célula eletroquímica usando um Falcon®.	37
Figura 2.3 - Biomodificação elétrodo de papel de fibra de carbono com anticorpo anti-trimetoprim policlonal.....	38
Figura 3.1 – Análise por voltametria de onda quadrada de 10 μ M TMP em 0,1 M PBS pH 7,0 para os diferentes elétrodo (CP = papel fibra de carbono; GCE = elétrodo de carbono vítreo; PyrGE = elétrodo de grafite pirolítica; PGE = elétrodo de mina de grafite; BDD H-term = elétrodo de diamante dopado com boro com terminações H). Condições: frequência 20 Hz; degrau de potencial 0,01 V.	40
Figura 3.2 – Comparação da densidade de corrente do pico do trimetoprim para os diferentes elétrodo avaliados (n=3).	40
Figura 3.3 - Miniaturização da célula eletroquímica através de um tubo Falcon®.....	41
Figura 3.4 – (A) Voltamograma obtido e (B) curva de calibração do trimetoprim para um intervalo de concentrações entre 0,2 e 1 μ M. Leitura eletroquímica feita entre + 0,5 V a + 1,3 V e a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s.	42
Figura 3.5 - Efeito da concentração e do tempo de incubação do anticorpo anti-TMP policlonal na superfície do elétrodo (A = 0 μ g/mL; B = 100 μ g/mL; C = 250 μ g/mL; D= 500 μ g/mL) (Amarelo = 10 minutos; Cinza = 20 minutos; Azul = 30 minutos; Laranja = 60 minutos).	45
Figura 3.6 – (A) Efeito do volume de anticorpo na superfície do elétrodo para uma concentração de 100 μ g/mL e 20 minutos de incubação (Azul = 5 μ L; Laranja = 10 μ L; Cinza = 15 μ L; Amarelo = 20 μ L); (B) Sinal analítico (corrente por área de contacto) obtido pelos diferentes volumes de anticorpo usado, para uma concentração de trimetoprim de 0,4 μ M.	46
Figura 3.7 – Densidade de corrente do biossensor em função da concentração de trimetoprim entre 0,2 e 3,0 μ M e usando os parâmetros ótimos de anticorpo (Cinza = elétrodo de carbono).	47
Figura 3.8 - Reta de calibração obtida com o biossensor entre 1,2 e 2,8 μ M de trimetoprim (n=9). Dados obtidos por voltametria de onda quadrada, de 0,3 V a 1,5 V, velocidade de varrimento de 0,375 V/s, frequência de 25 Hz e degrau de potencial de 0,015 V.	48
Figura A.1 – Voltametria de onda quadrada obtida com um elétrodo de carbono vítreo em solução com 10 μ M de trimetoprim.	59
Figura A.2 - Voltametria de onda quadrada obtida com elétrodo de CP em solução com 10 μ M de trimetoprim (CP = papel de fibra de carbono; CPT = Com pré-tratamento eletroquímico; SPT = Sem pré-tratamento eletroquímico).	60
Figura A.3 - Voltametria de onda quadrada obtida com elétrodo de grafite em solução com 10 μ M de trimetoprim.....	60
Figura A.4 - Voltametria de onda quadrada obtida com elétrodo de grafite pirolítica em solução com 10 μ M de trimetoprim.	61
Figura A.5 - Voltametria de onda quadrada obtida com elétrodo de diamante dopados com boro em solução com 10 μ M de trimetoprim (H-term).	61
Figura A.6 - Voltametria de onda quadrada obtida com elétrodo de diamante dopados com boro em solução com 10 μ M de trimetoprim (O-term).	62

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Propriedades farmacológicas e físico-químicas do trimetoprim.	3
Tabela 1.2 - Limitações e vantagens de diferentes materiais usados em elétrodos de trabalho (Kelly, 2020).	21
Tabela 1.3 - Aplicações de diferentes tipos de nanomateriais em diferentes áreas.	32
Tabela 3.1 - Recuperação obtida do analito para diferentes concentrações.	49
Tabela B.1 - Dados usados para a comparação da altura dos picos do trimetoprim para os diferentes elétrodos avaliados.	62

Lista de Abreviaturas

BDDE	Eléctrodo de Diamante Dopado com Boro
CBZ	Carbamazepina
CP	Papel de fibra de carbono
CS	Quitossano
CuO	Óxido de Cobre
CV	Voltametria Cíclica
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzimas
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
EUA	Estados Unidos da América
FTO	Óxido de estanho dopado com flúor
GCE	Eléctrodo de Carbono Vítreo
GPES	<i>General Purpose Electrochemical System</i>
HCB	Hexaclorobenzeno
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LOD	Limite de Deteção
LOQ	Limite de Quantificação
LSV	Voltametria de Varrimento Linear
MOFs	Estruturas Metalorgânicas
NG	Grafeno Dopado com Nitrogénio
NPs	Nanopartículas
NTC	Nanotubos de Carbono
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>

PEDOT:PSS	Poli(3,4-etilenodioxitiopeno) poliestireno sulfonato
PGE	Minas de grafite
PyrGE	Eléctrodo de Grafite Pirolítica
QDs	<i>Quantum Dots</i>
RGO	Óxido de Grafeno Reduzido
SHE	<i>Standard Hydrogen Electrode</i>
SPE	Extração de fase sólida
SPME	Microextração de fase sólida
SWV	<i>Square Wave Voltammetry</i>
TMP	Trimetoprim
UV	Ultravioleta
ZnO NRs	Nanobastões de óxido de zinco
β-HCG	Gonadotrofina Coriônica Humana Beta

1 Introdução

1.1 Indústria farmacêutica e a sua evolução

O desenvolvimento das atividades antropogénicas ao longo das últimas décadas tem permitido a criação de inúmeros produtos úteis em várias áreas, os quais têm auxiliado atividades necessárias para a nossa sobrevivência, sendo uma delas a indústria farmacêutica. Esta indústria teve os seus primórdios nos finais do século XIX, possuindo empresas pioneiras como a Bayer, Ciba e Sandoz, situadas na Europa. Posteriormente, no início do século XX, os Estados Unidos da América (EUA) iniciaram o desenvolvimento dos seus próprios produtos farmacêuticos. No entanto, devido à falta de tecnologia e evolução da época, os EUA eram dependentes de tecnologias fornecidas pelas empresas europeias até ao início da 1ª Guerra Mundial. A indústria farmacêutica esteve estagnada e não demonstrou grande desenvolvimento até ao ano 1939, onde um número limitado de medicamentos foi introduzido no mercado, sendo os mais relevantes os alcaloides e as sulfonamidas. O nascer da “indústria farmacêutica moderna” (também conhecida como a Era Dourada) surgiu efetivamente nos anos 40 como resposta a várias doenças que surgiram na altura (Malerba & Orsenigo, 2015). Em 2014, o rendimento total de produtos farmacêuticos a nível mundial atingiu 1 trilião de dólares americanos e, em 2017, teve rendimentos de 1,1 triliões. Desde então este mercado tem crescido a um ritmo anual de 5,8%, contando com rentabilidade de 1,4 triliões em 2021 (Peña *et al.*, 2021).

Este elevado crescimento resultou numa melhor qualidade de vida para a população, uma vez que certas doenças foram amenizadas ou até tratadas com a ajuda de medicamentos específicos. Existe, no entanto, uma problemática associada a esta evolução que se tem vindo a notar nas últimas décadas. Elevadas concentrações de medicamentos e produtos de higiene pessoal têm sido detetadas em corpos de água e ambientes aquáticos, levando a efeitos deteriorantes para habitats aquáticos e seres vivos que neles habitam (Ebele *et al.*, 2017). A principal razão da presença destes compostos em ambientes aquáticos provém essencialmente da aplicação humana e veterinária, dado que cerca de 30 a 90% dos compostos bioativos são libertados através de urina ou fezes. Adicionalmente, a incapacidade e inexistência de infraestruturas para a remoção destes compostos nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) piora o panorama (Décima *et al.*, 2021). Outras formas de libertação destes compostos para o meio ambiente é através o descarte de medicamentos para o lixo doméstico ou através da incorporação do estrume animal para o solo de agricultura, fazendo com que os compostos entrem na cadeia alimentar não só de humanos como de outros seres vivos que entrem em contacto com a mesma (Ebele *et al.*, 2017). Ainda, resíduos farmacêuticos podem ser encontrados em alimentos devido aos tratamentos realizados em produtos alimentares derivados de animais como gado, porcos e peixe (Adrián *et al.*, 2009).

Deste modo, a presença de compostos bioativos provenientes de medicamentos ou produtos de higiene pessoal torna-se preocupante devido principalmente às propriedades físico-químicas, as quais são responsáveis pela persistência, bioacumulação e ainda toxicidade. A persistência refere-se à dificuldade na remoção destes compostos da água através de processos de tratamento convencionais, como já referido no caso das ETARs. Embora alguns dos compostos não sejam considerados persistentes *per se*, o facto do seu uso ser contínuo e crescente nos últimos anos, tornou a sua libertação para os corpos aquáticos igual ou superior à taxa de remoção dos mesmos através de biodegradação, fotodegradação ou sorção particular, passando a ser então denominados pelo termo “pseudo-persistentes” (Ebele *et al.*, 2017). Alguns estudos realizados por Löffler *et al.* demonstraram que compostos como o ibuprofeno e o paracetamol são considerados pouco persistentes, onde o tempo de dissipação (DT50; tempo que um determinado composto demora para alcançar metade da concentração/quantidade inicial) variou entre 3,1 a 7 dias; compostos como

o oxazepam e iopromida são considerados moderadamente persistentes, cujo tempo de dissipação varia entre 15 e 54 dias; e compostos como carbamazepina (CBZ) e diazepam são classificados como altamente persistentes, com um tempo de dissipação entre 119 e 328 dias (Löffler *et al.*, 2005).

A bioacumulação em meios aquáticos refere-se normalmente ao aumento da concentração de contaminantes em organismos aquáticos como resposta ao aumento destes contaminantes no meio envolvente, isto é, da água e/ou alimentos (Wang, 2016). Este problema é atualmente bastante recorrente e por este motivo vários estudos descreveram e demonstraram a presença de compostos farmacêuticos e de produtos de higiene pessoal em várias espécies marinhas. Alguns exemplos são a presença de CBZ na alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e em crustáceos; oxazepam em percas europeias; e genfibrozila em peixes-dourados (Ebele *et al.*, 2017).

A toxicidade, também definida pelas propriedades físico-químicas dos compostos, é um problema preocupante devido, principalmente, a compostos como diclofenac, uma vez que este é especificamente produzido e designado para atingir mecanismos metabólicos e enzimáticos específicos, tornando-os tóxicos. Segundo Hoeger *et al.* (2005), o diclofenac é capaz de danificar os rins e guelras de certas espécies aquáticas (Hoeger *et al.*, 2005). Outra problemática resultante da libertação destes compostos para o meio ambiente aquático é a capacidade de disrupção endócrina, isto é, a capacidade de causar efeitos adversos na saúde dos organismos e os seus progenitores ou subpopulação. Alguns compostos que demonstram efeitos de disrupção endócrina são o diclofenac e o estradiol, como descrito nos estudos de Godoi *et al.* (2020) e Nazari & Suja (2016), respetivamente (Godoi *et al.*, 2020; Nazari & Suja, 2016). O estudo de Mimeault *et al.* mostrou que a exposição de peixes-dourados a genfibrozila resultou na redução de testosterona em 50% após 14 dias, demonstrando a toxicidade destes compostos (Mimeault *et al.*, 2005).

1.1.1 Poluentes emergentes

Os poluentes emergentes (ou contaminantes emergentes) são definidos como qualquer substância química naturalmente ou sinteticamente presente ou qualquer microrganismo que não é monitorizado de forma comum no ambiente, mas que possui capacidade de entrar no mesmo e causar efeitos ecológicos adversos (suspeitos ou conhecidos) e/ou efeitos negativos na saúde humana. É importante lembrar que grande parte destes compostos não são recentes no meio ambiente, sendo poluentes bem estabelecidos nos diferentes ecossistemas, tendo sido recentemente descobertos os seus efeitos tóxicos negativos para esse mesmo ecossistema e, portanto, a palavra “emergente” refere-se à preocupação crescente e não propriamente ao carácter recente com que foi introduzido ou descoberto como poluente (Rosenfeld & Feng, 2011). Os compostos farmacêuticos são um importante grupo de contaminantes emergentes devido à grande diversidade de compostos existentes e à falta de regulamentação sobre a presença de muitos destes compostos no meio ambiente. Além do mais, o consumo de fármacos tem vindo a aumentar (devido ao aumento da população mundial), assim como ao aumento da esperança média de vida, o que leva consequentemente a um aumento da presença destes compostos no meio ambiente. Especificamente, os antibióticos são uma classe de fármacos a ter em conta, uma vez que o seu consumo sem um controlo rigoroso ou justificado poderá implicar o surgimento de resistência antimicrobiana tanto no meio aquático como nos humanos. A sua presença no meio ambiente é também substancial devido ao grande consumo por parte humana, mas também devido ao seu uso no setor da aquacultura (Torrinha *et al.*, 2020).

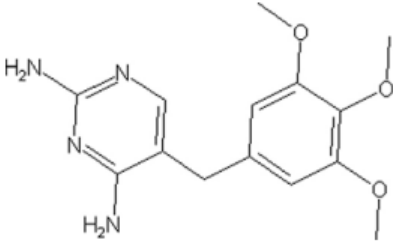
1.1.1.1 Trimetoprim (TMP)

O TMP é um agente dihidropirimidina antimicrobiano e antiparasítico que faz parte de um grupo de medicamentos que inibe a enzima dihidrofolato redutase em células bacterianas e protozoárias. Este composto foi inicialmente introduzido como um agente antimalárico, mas atualmente é usado como um agente antibacteriano. É um medicamento que é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal tendo posteriormente um efeito sistémico. É normalmente comercializado em forma de cristais ou pó com cor branca-creme. Adicionalmente, na sua forma comercializada, não possui qualquer cheiro, é amargo e tem ponto de fusão a 200 °C (Scholar, 2007).

O TMP pode ser usado para o tratamento de infeções causadas por bactérias como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ou outras espécies *Enterobacter*. Embora exista e possa ser comercializado como agente único, tendo propriedades bacteriostáticas, raramente é assim feito. Ou seja, este composto é regularmente usado em combinação com outros compostos como o sulfametoxazol (da classe das sulfonamidas) para a obtenção de efeitos sinérgicos e bactericidas. Geralmente, estas combinações levam ao tratamento de infeções no trato urinário, infeções prostáticas ou tratamento de pneumonia (Kester *et al.*, 2012). Especificamente, a combinação com sulfametoxazol foi introduzida pela primeira vez nos anos 60, por F. Hoffmann-La Roche, com o nome comercial Bactrim® (Straub, 2013). Adicionalmente, outro exemplo relevante é a combinação de TMP com polimixina B, existindo ainda a possibilidade de tratamento de outras doenças como a conjuntivite aguda (Kester *et al.*, 2012).

A Tabela 1.1 apresenta dados relevantes sobre este composto (TMP).

Tabela 1.1 - Propriedades farmacológicas e físico-químicas do trimetoprim.

Estrutura (Scholar, 2007)	
Massa molecular (Scholar, 2007)	290,321 g/mol
Fórmula química (Scholar, 2007)	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃
Meia-vida (Straub, 2013) (Mpatani <i>et al.</i> , 2021)	30-42 dias
Excreção (Mpatani <i>et al.</i> , 2021)	~ 20% absorvida; ~ 80% excretada em urina e fezes

Tal como outros antibióticos, o TMP também é detetado no ambiente de forma regular, dado que cerca de 80% do composto é excretado através da urina e fezes (Mpatani *et al.*, 2021). Segundo Jewell *et al.* (2016), o TMP foi detetado em efluentes de ETARs com concentrações de 0,02 e 1,3 µg/L. Em rios, embora exista uma diluição natural do composto comparativamente aos efluentes de ETARs, foram

reportadas concentrações de 0,02 µg/L no Reino Unido, e 0,04 µg/L no Japão (Jewell *et al.*, 2016). Adicionalmente, vários outros estudos detetaram a presença deste composto em águas superficiais na Alemanha e EUA com concentrações de 200 e 710 ng/L, respetivamente, em ETARs alemãs com concentrações de 660 ng/L, concentrações de 600-760 µg/L em efluentes de águas residuais de hospitais na Suécia, concentrações de 120-160 µg/L em efluentes de águas residuais dos Países Baixos e ainda 800 ng/L em efluentes de águas residuais europeias (Mpatani *et al.*, 2021). Segundo Moles *et al.* (2020), a massa de TMP diária proveniente de ETARs, por 1000 habitantes, pode chegar até 35 mg (Moles *et al.*, 2020).

A principal preocupação ambiental com este poluente emergente é o aumento da resistência de diferentes estirpes bacterianas resultante da sua presença nos corpos aquáticos, juntamente com a alteração da flora natural (Villanueva *et al.*, 2020). Nos seres humanos, os principais efeitos adversos são semelhantes aos provocados pelas sulfonamidas, isto é, infeções dérmicas pruriginosas, problemas gastrointestinais, anormalidades hematológicas ou mesmo febre. Em pacientes com HIV, estes sintomas tendem a ter uma maior incidência (Kester *et al.*, 2012). Além disso, quando mulheres grávidas estão expostas a esta substância durante longos períodos, existe a possibilidade de malformações congénitas nos fetos (Mpatani *et al.*, 2021). Deste modo, vários países já têm valores máximos residuais estabelecidos para o TMP em alimentos. Na União Europeia e na China, estes valores não podem ultrapassar os 50 µg/kg em carne de porco, galinha e em peixes. A deteção de TMP residual em amostras de comida é atualmente realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada com detetor por ultravioleta (HPLC-UV), HPLC com deteção de matriz de díodo, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e cromatografia de interação hidrofílica. No entanto, estas técnicas de deteção são caras, necessitam de pré-tratamento de amostra, tempos de análise elevados e requerem pessoal especializado para a elaboração do procedimento e análise de resultados. Assim, o Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (vulgarmente conhecido como ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tem sido bastante utilizado na deteção de micróbios, proteínas, alérgenos, pesticidas, hormonas, toxinas e também pequenas quantidades de antibióticos devido à sua sensibilidade, simplicidade e custo-benefício (Chen *et al.*, 2016).

Existem atualmente técnicas de remoção biológica deste composto até 40 ou 50%. No entanto, os estudos feitos sobre esta temática tendem a ser contraditórios, isto é, alguns referem que o TMP é resistente a técnicas de remoção biológica, e outros que este composto é quase completamente removido (Jewell *et al.*, 2016). De acordo com um estudo realizado na Suécia, vários compostos foram sujeitos a uma quantificação na entrada e na saída de um sistema de lamas ativadas para se perceber a interação destes compostos com material coloidal. O TMP, composto presente no estudo, juntamente com o sulfametoxazol, mostraram-se resistentes ao tratamento (Lindberg *et al.*, 2006). Outros tratamentos que mostraram ineficácia na remoção deste composto são a filtração, floculação e coagulação. Atualmente, os tratamentos mais comuns para a remoção do TMP são processos de oxidação avançados (os quais conseguem alcançar eficiências de remoção até 90%), adsorção, ou, como já referido, processos biológicos (Mpatani *et al.*, 2021).

1.1.2 Legislação

Embora a questão dos poluentes emergentes seja um assunto cada vez mais preocupante a nível mundial, existe pouca legislação para este tipo de contaminação ambiental. No entanto, recentemente foi proposta a introdução de novas substâncias numa “lista de vigilância” por poderem representar um risco significativo para o meio aquático. Esta lista está estabelecida na diretiva 2013/39/UE (2013) e refere, pela primeira vez, a contaminação das águas e dos solos por resíduos farmacêuticos como um problema ambiental. Nesta lista são mencionadas 10 substâncias ou grupo de substâncias, algumas das quais, compostos farmacêuticos: um anti-inflamatório não-esteróide (diclofenac), as hormonas estradiol (E2), etinilestradiol (EE2) e estrona (E1), e os antibióticos da classe dos macrólidos (eritromicina, claritromicina e azitromicina). Adicionalmente, de acordo com a decisão de execução 2020/1161 de 4 de agosto de 2020, em 2019 foram recolhidos dados adicionais sobre outras substâncias que poderiam ser incluídas na lista de vigilância, dado o seu caráter tóxico. Entre estas substâncias adicionadas, estavam presentes compostos como o sulfametoxazol, o TMP, a venlafaxina, alguns pesticidas e compostos azólicos, bem como os fungicidas famoxadona e dimoxistrobina (Iria, 2018; Leal, 2020; Diretiva 2013/39/EU, 2013; Decisão 2020/1161, 2020).

Paralelamente, na Europa existem alguns Regulamentos (atos legislativos) para todos os Estados-Membros com o objetivo de avaliar e controlar o impacto destas substâncias no ambiente aquático e, deste modo, proteger os ecossistemas e a saúde pública. Alguns destes Regulamentos são a lei REACH (Registo, Avaliação, Autorização, e Restrição de Químicos, EC 1907/2006), com o objetivo de aplicar o uso seguro de substâncias químicas; a DWD (Diretiva de Água Potável, Conselho Diretivo 98/83/EC); e Diretivas de Águas Residuais Urbanas (91/271/EEC e 98/15/EC). Adicionalmente, o WFD (Quadro Diretivo de Água, 2000/60/EC) tem como propósito fornecer a informação necessária para se preservar e manter os ecossistemas aquáticos limpos e seguros, particularmente os de água doce, como os lagos, rios, estuários, águas costeiras e lençóis freáticos (Adrián *et al.*, 2009).

A nível mundial, a Organização das Nações Unidas (ONU) foi responsável por introduzir os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) que devem ser alcançados até 2030. Estes objetivos variam entre diferentes problemas atuais a nível global, desde a erradicação da fome até à promoção de sistemas de agricultura sustentáveis ou diminuição da poluição e alteração do clima. Na Figura 1.1 estão presentes estes objetivos (Elli *et al.*, 2022).



Figura 1.1 - Os diferentes Objetivos de Desenvolvimento Sustentável impostos pela Organização das Nações Unidas (figura retirada de ODS, n.d.).

Mais precisamente, o ODS número seis, “Água Potável e Saneamento”, tem como objetivo alcançar a segurança no consumo de água a nível mundial, isto é, dar possibilidade de acesso de água potável a toda a população mundial, enquanto se diminui a poluição marinha e se melhora a qualidade da água em geral (Elli *et al.*, 2022).

De modo a alcançar estes objetivos estabelecidos pela ONU é de maior interesse ter acesso a dispositivos ou equipamentos de medição capazes de identificar, quantificar e monitorizar contaminantes emergentes em amostras ambientais aquáticas e agrícolas, que sejam ao mesmo tempo de baixo custo, precisos e de resposta rápida. Tais dispositivos permitem uma rápida deteção dos contaminantes referidos, oferecendo a possibilidade de resposta célere ao problema.

1.1.3 Técnicas tradicionais para a deteção de poluentes emergentes

Como já referido, os poluentes emergentes não são uma problemática recente, dado que já se conhece a sua presença em diferentes ecossistemas. Estes contaminantes afetam a saúde pública de variadas maneiras, tal como em casos específicos como hepatite, gripe (*influenza*), síndrome respiratória aguda grave, pneumonia, úlceras gástricas e doenças pulmonares. Adicionalmente, sabendo que o sistema aquático é uma mais-valia para o ser humano através do fornecimento de diferentes bens de consumo como alimentos, várias técnicas foram sendo desenvolvidas e/ou adaptadas a esta problemática, de modo a identificar a presença de poluentes emergentes em corpos aquáticos (Zulkifli *et al.*, 2018).

Segundo Zulkifli *et al.* (2018), os contaminantes emergentes são divididos em duas categorias: os contaminantes não biológicos como cloro, enxofre, sódio, sílica ou mercúrio; e contaminantes biológicos como *pseudomonas*, *Legionella*, *Giardia* ou *E. coli*. Os contaminantes não biológicos são mais frequentemente encontrados perto de centros urbanos, onde a poluição e rejeição indevida de compostos provenientes de atividades antropogénicas é realizada. Segundo a ONU os contaminantes biológicos mais comuns em fontes de água potáveis são *Legionella*, *Pseudomonas*, *Giardia*, *E. coli* e *Cryptosporidium* (Zulkifli *et al.*, 2018).

Imunossensor para a deteção de fármacos como contaminantes emergentes

Como é possível observar pela Figura 1.2, várias tecnologias foram usadas ao longo dos anos para a deteção de poluentes emergentes, cada uma sujeita a melhorias e adaptações, ou mesmo sendo substituída por técnicas mais eficazes e de fácil utilização. No início dos anos 20, a deteção dos poluentes emergentes era realizada maioritariamente a nível laboratorial, o que, convencionalmente, torna a fermentação em tubos múltiplos, métodos de filtração, amplificação de DNA, técnicas de hibridação de fluorescência *in vitro*, eletroforese capilar, cromatografia e espectrometria de massa, como sendo as técnicas mais usadas. Estas técnicas a nível laboratorial, embora muito eficazes, demonstram a desvantagem da impossibilidade de aplicações no local (Zulkifli *et al.*, 2018).

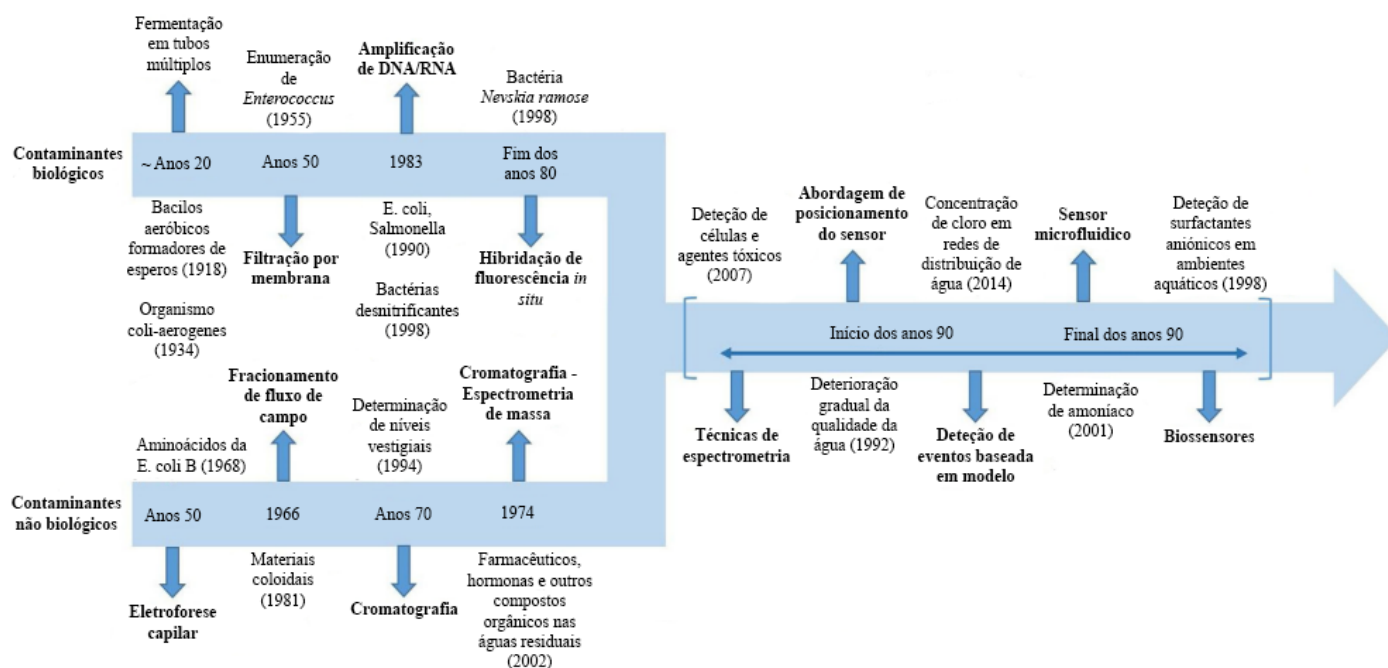


Figura 1.2 - Diferentes técnicas usadas para a deteção de contaminantes emergentes ao longo das décadas e alguns exemplos usando essas mesmas técnicas (figura adaptada de Zulkifli *et al.*, 2018).

Com o contínuo avanço tecnológico verificam-se melhorias contínuas das técnicas utilizadas no domínio da química analítica, nomeadamente na introdução de espectroscopia avançada, sensores de qualidade de água e biossensores. Adicionalmente, alguns sensores sem fios (*wireless*) foram adaptados a várias técnicas para uma portabilidade superior (Zulkifli *et al.*, 2018).

1.2 Biossensores

Uma rápida forma de se poder determinar a presença de certo composto em determinadas amostras é através de biossensores. Estes têm sido cada vez mais utilizados nos últimos anos e têm criado grandes expectativas em diversas áreas e setores industriais, tal como agrícola, tratamento de águas, alimentar e farmacêutica. Comparativamente aos métodos tradicionais de deteção de compostos emergentes, os biossensores possuem vantagens como a multi-análise, desenvolvimento de métodos na área analítica, fácil uso e elevada portabilidade (Adrián *et al.*, 2009).

Os imunossensores – exemplo de biossensor – usam anticorpos para reconhecer elementos biológicos e, assim, poder responder seletivamente às substâncias bioativas de uma maneira fisiológica. Adicionalmente, quando acoplados com nanomateriais, os anticorpos demonstram ser biossensores com elevada eficácia (Adrián *et al.*, 2009).

Outra área de ação dos biossensores – que surgem como resposta à problemática supracitada – é na monitorização de riscos biológicos e químicos, principalmente em corpos aquáticos ou nos organismos que neles habitam. Na literatura existem já vários documentos que fornecem melhores ferramentas analíticas para avaliar os riscos de contaminação, demonstrando o crescimento da preocupação por este problema que cada vez mais se tem vindo a mostrar relevante (Adrián *et al.*, 2009).

Os biossensores são definidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) como equipamentos recetores-transdutores integrados que são capazes de fornecer informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico (Farré *et al.*, 2012). De modo simplificado, são equipamentos analíticos que convertem uma resposta biológica num sinal processável e quantificável. Relativamente à sua constituição, os biossensores mais típicos/comuns são constituídos por um biorreceptor, transdutor, amplificador de sinal e um processador de sinal (*software* computacional) (Grieshaber *et al.*, 2008).

O biorreceptor é um componente biológico, tal como ácidos nucleicos, células, anticorpos, enzimas, etc., responsável por se ligar especificamente ao analito de interesse. De seguida, depois do analito se ter ligado a um biorreceptor, o evento biológico ocorre numa interface, o transdutor, onde é gerado um sinal mensurável. Os transdutores podem ser baseados em princípios elétricos, eletroquímicos, óticos, piezoelétricos, térmicos e acústicos (Figura 1.3). Este sinal é amplificado num circuito detetor, o qual é depois processado por um *software* apropriado, tornando-o num parâmetro físico com significado, descrevendo então o processo a ser investigado. Estes parâmetros são dispostos num *display* que é responsável por demonstrar os resultados que serão posteriormente analisados (Grieshaber *et al.*, 2008). Um esquema do princípio de funcionamento e dos vários tipos de biossensores existentes é visível na Figura 1.3. Dentro do eletroquímico, este pode ser amperométrico, potenciométrico, voltamétrico, condutimétrico e impedimétrico (por exemplo, espectroscopia de impedância eletroquímica) (Thakur & Kumar, 2022). Os biossensores mais comuns são os baseados em princípios elétricos ou eletroquímicos, usando elétrodos como transdutores, ou ainda transístores FET (*field-effect transistors*) e nanomateriais condutores elétricos tal como exemplificado na Figura 1.4.

Imunossensor para a deteção de fármacos como contaminantes emergentes



Figura 1.3 - Ilustração da composição de um biossensor. Diferentes classes de transdutores, de acordo com o mecanismo de funcionamento (figura adaptada de Thakur & Kumar, 2022).

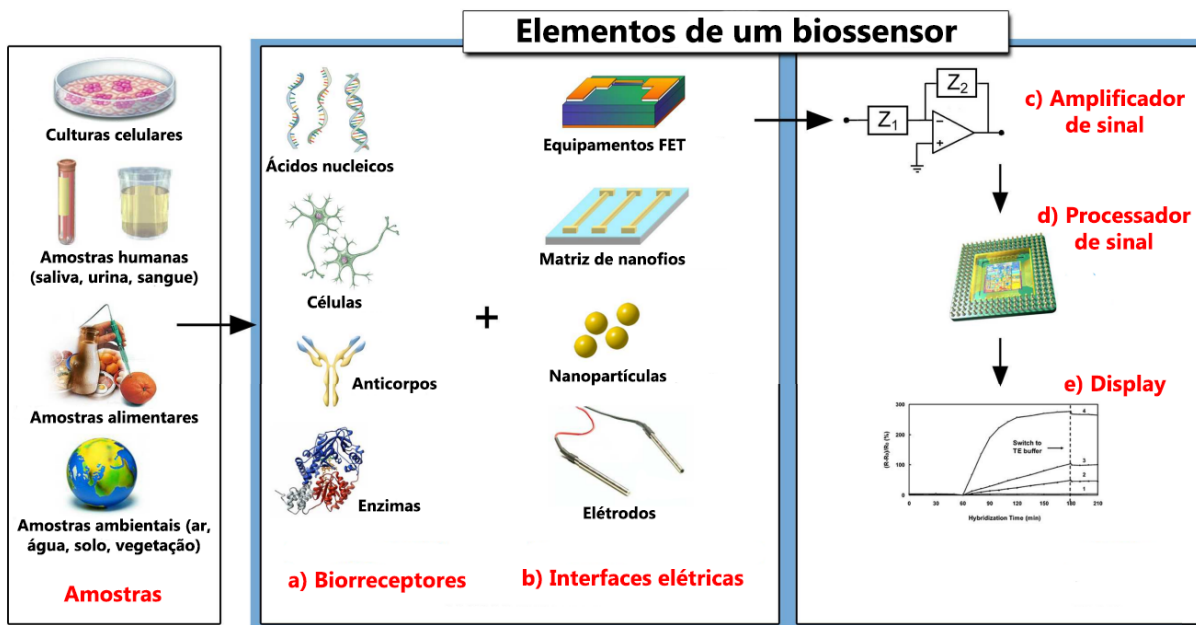


Figura 1.4 - Elementos que constituem um biossensor comum (figura adaptada de Grieshaber *et al.*, 2008).

Como visível na Figura 1.4, os elementos de reconhecimento (biorreceptores) são de origem biológica com elevada biocompatibilidade e disponibilidade, tais como anticorpos, células, enzimas ou aptâmeros (Figura 1.5) (Elli *et al.*, 2022) (Grieshaber *et al.*, 2008).



Figura 1.5 - Exemplo de elementos biológicos de reconhecimento (figura adaptada de Elli *et al.*, 2022).

Os anticorpos são proteínas imunológicas produzidas pelo sistema imunitário como resposta a um antígeno. Por isso, trata-se de elementos biológicos altamente precisos e específicos ao analito. No entanto, são normalmente caros e o seu isolamento é moroso e trabalhoso (Elli *et al.*, 2022).

As células são provavelmente o elemento de reconhecimento biológico mais barato devido à sua elevada disponibilidade e métodos de preparação simples. A grande desvantagem das células está presente no facto de serem organismos vivos e que, portanto, precisam de ambientes controlados, o que nem sempre é possível alcançar quando existe desenvolvimento de biossensores (Elli *et al.*, 2022).

As enzimas são elementos biológicos proteicos que atuam como catalisador em reações, isto é, diminuem a energia de ativação necessária para que dada reação ocorra. Tal como os anticorpos, as enzimas apresentam uma elevada seletividade para o analito de interesse, bem como uma grande afinidade. A principal desvantagem é a facilidade com que a degradação pode decorrer, já que, como se trata de proteínas, são muito sensíveis a variações de pH e temperatura, tornando a sua produção e consequente aplicação em biossensores desafiante. Uma das vantagens do uso de enzimas em biossensores passa pela possível reutilização das mesmas, caso a reação em questão seja reversível, o que dá, por consequência, uma possibilidade de reutilização do biossensor como um todo (Elli *et al.*, 2022).

Os aptâmeros consistem essencialmente em cadeias de DNA ou RNA. Uma das grandes especificidades destes elementos biológicos são a sua sequência singular o que, por consequência, lhes dá uma estrutura única. Para além da elevada seletividade conferida pelos aptâmeros, possuem ainda boa termoestabilidade (Elli *et al.*, 2022).

Um dos tipos de biorreceptores mais usados são os anticorpos. A sua aplicação no desenvolvimento de biossensores permite-os classificar como imunossensores. Estes podem ser baseados em diferentes princípios, sendo alguns deles do tipo *label-free*, *sandwich* ou competitivo, sendo estruturalmente semelhante ao que se encontra nos testes ELISA. O biossensor *label-free* consiste na ligação direta de um antígeno a um anticorpo, formando o complexo antígeno-anticorpo. Este tipo de princípio simplifica a preparação e operação do procedimento, dado que mede diretamente as mudanças químicas e físicas resultantes da ligação e formação do complexo. Devido à sua rapidez e facilidade na preparação, este princípio tem sido muito utilizado (Wei *et al.*, 2020). Um imunossensor do tipo *sandwich* consiste, tal como o nome menciona, em detetar um antígeno por intermédio de dois anticorpos, tal como visível na Figura 1.6, também conhecido como um processo de deteção indireto (anticorpo-analito-anticorpo). Este tipo de

testes demonstra uma especificidade superior, dado que a adsorção é mais seletiva (Balkourani *et al.*, 2021). Por fim, os imunossensores do tipo competitivo consistem na competição entre o analito e uma substância marcada pelo acesso ao epítopo de um anticorpo (Figura 1.7). Devido ao número limitado de anticorpos geralmente presentes, este princípio também é conhecido como o teste de reagente limitante. O procedimento de preparação consiste na imobilização de anticorpos a uma superfície, seguida de uma incubação numa solução com uma mistura de quantidade conhecida de substância marcada e quantidade desconhecida de analito. Assim, o sinal obtido da substância marcada é inversamente proporcional à quantidade de analito presente (Mollarasouli *et al.*, 2019).

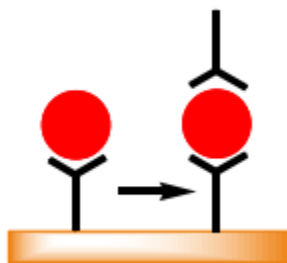


Figura 1.6 - Esquema de um imunossensor *sandwich* (Mitchell, 2010).

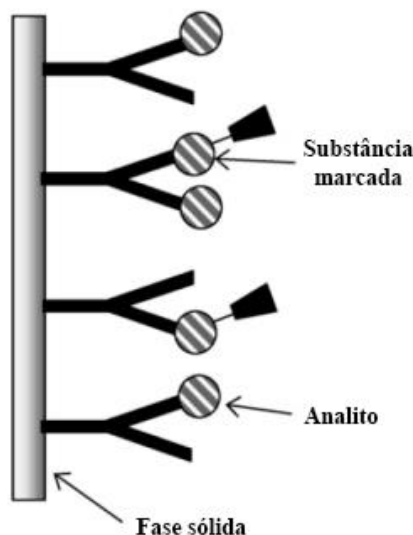


Figura 1.7 - Representação esquemática de um imunossensor competitivo (Mollarasouli *et al.*, 2019).

A construção de um biossensor deve ainda ter em atenção algumas condições para oferecer um bom uso e resultados. Essas condições passam pela (i) alta especificidade, estabilidade e baixas variações do biorreceptor; (ii) pela reduzida interferência de parâmetros como a agitação, pH e temperatura, permitindo um pré-tratamento mínimo; (iii) uma resposta precisa, reproduzível e linear para uma gama de concentração de interesse; (iv) quando utilizado para casos clínicos, a sonda deve ser biocompatível e não tóxica; (v) rápida análise e resposta (em tempo real) para amostras humanas; (vi) custo reduzido, miniaturização e fácil utilização/manuseio (Grieshaber *et al.*, 2008).

Os biossensores são construídos com o propósito de serem altamente específicos, isto é, são capazes de realizar uma interação específica com os compostos ou moléculas desejadas. Atualmente, uma grande

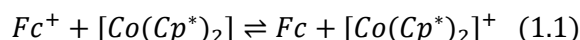
diversidade de biossensores pode ser encontrada em laboratórios de investigação, com maiores produções, sendo usados como ferramentas de diagnóstico *in situ*. Estes podem ser classificados em métodos elétricos e não elétricos, sendo os não elétricos baseados em métodos óticos, estereoscópicos ou codificados geneticamente, o que os torna caros e com falta de seletividade. Adicionalmente, a produção destes biossensores tem a limitação do custo-eficácia e a dificuldade em minimizar o princípio de transdução (conservação de energia). Já os biossensores eletroquímicos não demonstram tais limitações devido ao desenvolvimento contínuo de produção de circuitos multi-eletrónicos de baixo custo e a sua fácil interface com processamento e leitura eletrónica. Outras vantagens presentes nos biossensores eletroquímicos são a robustez, fácil miniaturização, excelentes limites de deteção e uso de baixos volumes de analitos. São normalmente baseados em transístores, impedância, resistência, capacitância ou potencial elétrico. Os biossensores aliados à eletroquímica têm-se tornado uma opção atraente principalmente quando aliados à nanotecnologia, de modo a diminuir os elementos eletroquímicos sensoriais a dimensões reduzidas que permitem aumentar o sinal obtido (Grieshaber *et al.*, 2008) (Elli *et al.*, 2022). Este tipo de biossensores constitui um sistema híbrido, nos quais o reconhecimento do composto é realizado por uma enzima catalítica enquanto a transdução é feita por um elemento sensorial químico (Chaniotakis & Fousfaki, 2014).

Historicamente, apenas no final do século XX é que a era dos sensores começou a florescer e a desenvolver-se. Um dos primeiros artigos/estudos a ser publicados ocorreu em 1955/56, o qual referia a invenção do eléctrodo de oxigénio. Em 1962 surgiu outra publicação derivada da modificação do eléctrodo de oxigénio, a qual resultou no surgimento do primeiro sensor de glucose e melhoria de sensores eletroquímicos (Grieshaber *et al.*, 2008). Desde então, várias evoluções ocorreram e, em 1962, Clark e Lyons combinaram elementos de reconhecimento químico com elementos biológicos, surgindo o desenvolvimento de uma tecnologia inovadora para a altura, o “biossensor” (Chaniotakis & Fousfaki, 2014).

O capítulo seguinte refere os princípios da eletroquímica e no que a mesma se baseia a nível atómico. Adicionalmente, são expostas algumas técnicas eletroquímicas usadas nos (bio)sensores eletroquímicos.

1.3 Eletroquímica

A eletroquímica é a área de conhecimento que estuda reações químicas que de algum modo envolvem a transferência de eletrões, designadas de reações de oxidação-redução. Em química inorgânica, os compostos resultantes de uma reação química são geralmente um complexo metal que sofreu oxidação ou redução. Uma redução química consiste no uso de um agente redutor químico para realizar a transferência de um eletrão para o composto desejado. Por exemplo, na seguinte equação 1.1 o ferrocénio $[\text{Fe}(\text{Cp})_2]^+$ (Cp = ciclopentadienil) é reduzido a ferroceno $[\text{Fe}(\text{Cp})_2]$ devido ao composto $[\text{Co}(\text{Cp}^*)_2]$ (Cp* = pentametilciclopentadienil) que foi responsável pela doação de um dos seus eletrões, passando este a ser um anião (Elgrishi *et al.*, 2017).

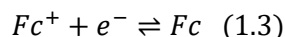


A transferência de eletrão ocorreu porque a orbital molecular desocupada mais baixa do Fc^+ tem uma energia menor que a orbital molecular ocupada mais alta do $[\text{Co}(\text{Cp}^*)_2]$. Deste modo, a transferência do eletrão é termodinamicamente favorável e a força motriz da reação é a diferença na energia dos níveis (Elgrishi *et al.*, 2017). Neste caso específico, a transferência de eletrões ocorre rapidamente e sem existência de barreiras termodinâmicas significativas, o que torna esta reação reversível (ou electroquimicamente reversível), significando que o composto reduzido pode voltar a ficar oxidado. Isto é também evidenciado pelas setas bidirecionais presentes na equação, que normalmente representam o equilíbrio em expressões. Contrariamente, se uma reação apresenta barreiras ou dificuldades à transferência de eletrões, então diz-se irreversível ou electroquimicamente irreversível, e uma reação deste género seria representada com a seguinte equação 1.2 (Kelly, 2020):



Como é possível observar, o produto final Z não pode ser novamente convertido à sua forma oxidada original, demonstrando ser irreversível (Kelly, 2020).

Uma redução termoquímica tem o mesmo modo de funcionamento relativamente a transferência de eletrões. A única diferença é o uso de um elétrodo, o qual vai ser responsável por fornecer o eletrão necessário, em vez de uma espécie química como no exemplo supracitado. Tal é possível porque um elétrodo é tipicamente um condutor elétrico como platina, ouro ou mercúrio e, quando usado um indutor de energia externa (por exemplo um potencióstato), é possível aplicar uma voltagem que vai modular a energia dos eletrões no próprio elétrodo. Assim, quando esses eletrões possuírem uma energia superior à energia da orbital molecular desocupada mais baixa do Fc^+ , o eletrão é transferido (equação 1.3) (Elgrishi *et al.*, 2017).



Em simples palavras, a eletroquímica é uma técnica simples que permite controlar a força motriz das reações e obter parâmetros termodinâmicos e cinéticos das mesmas (Elgrishi *et al.*, 2017).

A ponto de curiosidade, a “habilidade” de conseguir detetar espécies químicas através de propriedades elétricas foi descoberta no início do século XX baseado nos estudos de Cremer (1906) com membranas de vidro. Mais tarde, em 1909, Fritz Haber e Zygmunt Klemensiewicz introduziram pela primeira vez uma membrana de vidro capaz de medir a acidez de uma solução, surgindo o famoso elétrodo de pH. Este elétrodo tem a capacidade de avaliar o pH através da medição do potencial elétrico de soluções.

Esse potencial elétrico está diretamente relacionado com a quantidade de iões de hidrogénio e a sua atividade nas duas faces da membrana de vidro (Chaniotakis & Fousfaki, 2014).

Um fator que afeta bastante os resultados obtidos por eletroquímica é o mecanismo de transporte de massa, isto é, a velocidade com que a espécie migra da solução para a superfície do eletrodo. De um modo geral, existem três mecanismos básicos de transporte de massa (Kelly, 2020):

- Difusão – passagem da espécie química de um local com grande concentração nessa espécie para outro local com baixa concentração (gradiente de concentração). Quanto maior a diferença de concentrações entre os dois pontos, maior é a velocidade de difusão. A lei de Fick é responsável pela descrição deste processo.
- Migração – define o movimento de espécies químicas/partículas num campo elétrico, onde a força motriz é a diferença de cargas.
- Convecção – representa o movimento “forçado” das espécies numa solução por meios de agitação mecânica.

Tipicamente, e de acordo com Pingarrón *et al.* (2020), as reações comuns que se realizam por eletroquímica são capazes de gerar uma corrente mensurável (amperometria), um potencial mensurável (potenciometria), uma alteração nas propriedades condutivas de uma solução entre eletrodos (condutimetria), medição da corrente elétrica necessária para que uma reação eletroquímica ocorra (coulometria) e, por fim, medição do complexo de impedância elétrica num sistema (impedanciometria) (Grieshaber *et al.*, 2008; Pingarrón *et al.*, 2020).

1.3.1 Métodos amperométricos

Os métodos amperométricos baseiam-se na medição continua da corrente resultante das reações de oxidação e redução de determinadas espécies eletroativas, controlando-se o potencial. Os métodos amperométricos usados em eletroanalítica são a cronoamperometria, voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial e voltametria de varrimento linear (Tajik *et al.*, 2021).

1.3.1.1 Cronoamperometria

A cronoamperometria é um dos métodos voltamétricos mais simples e, portanto, é também um dos mais usados. Em palavras simples, este método consiste na aplicação de um único passo de voltagem em t_0 e, de seguida, a respetiva medição da corrente resultante desse potencial aplicado, em função do tempo (Franklin *et al.*, 2016). Quaisquer mudanças que possam ocorrer nas camadas de difusão poderão resultar num aumento ou diminuição da corrente, dependendo da concentração do analito na superfície do eletrodo de trabalho, dado que a concentração desse analito é diretamente proporcional ao potencial. Este método pode ser realizado de duas formas: com um passo de potencial único (medição da corrente resultante de um único potencial aplicado) ou com passo múltiplo de potencial (aplicação de um potencial entre determinados valores, durante determinado tempo) (Rezaei & Irannejad, 2019).

Deste modo, a cronoamperometria decorre quando o potencial é estático, isto é, o potencial aplicado é constante durante a leitura. Um exemplo de uma aplicação de medições amperométricas está evidente nos testes de gravidez, os quais quando combinados com técnicas de deteção imunológica, são capazes de medir os níveis de Gonadotrofina Coriónica Humana Beta (β -HCG, do inglês *Beta Human Chorionic Gonadotropin*). Deste modo, a corrente obtida para um determinado valor de potencial é diretamente proporcional à concentração do analito na solução (Grieshaber *et al.*, 2008).

1.3.1.2 Voltametria cíclica (CV)

A voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) – técnica eletroquímica – é muito empregue no estudo de processos/reações de oxidação e redução. Na Figura 1.8 está evidente um exemplo de um voltamograma.

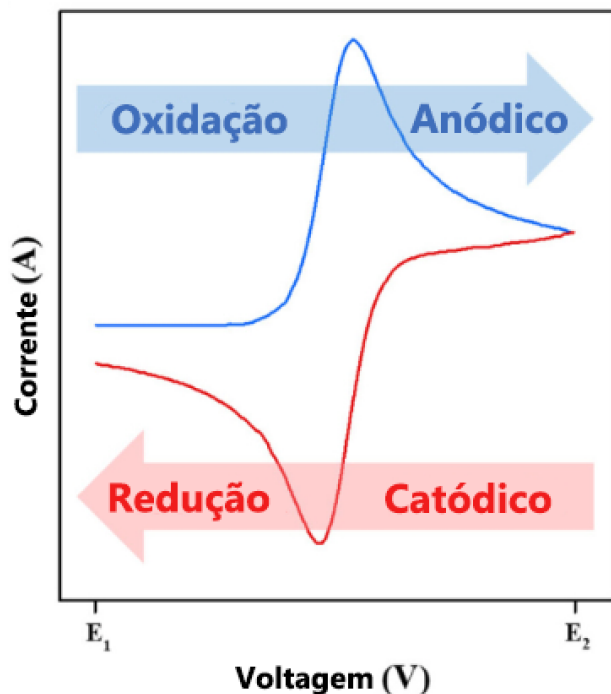


Figura 1.8 - Processo típico de oxidação-redução de uma espécie química que envolve a transferência de um eletrão (figura adaptada de Kim *et al.*, 2020).

No eixo das abcissas está presente o potencial aplicado (E , em Volts), enquanto o eixo das ordenadas representa a corrente (i , em Amperes) (Elgrishi *et al.*, 2017). O potencial é definido como o trabalho necessário para realizar o transporte de um eletrão para o ponto de interesse e está intrinsecamente dependente da carga existente na superfície do elétrodo: se existe um excesso de eletrões então o potencial é negativo; se ocorre uma ausência de eletrões então o potencial é positivo (Kelly, 2020). Geralmente, estes voltamogramas são representados de duas maneiras convencionais: a americana e a da IUPAC. A principal diferença entre as duas é a direção da digitalização/leitura (Figura 1.9). Isto, por consequência, resultará nos pontos superiores a representarem a redução para a convenção americana e a oxidação para a convenção IUPAC (Elgrishi *et al.*, 2017). Embora uma não apresente alguma vantagem em relação à outra, há que ter atenção à convenção a ser usada (Kelly, 2020).

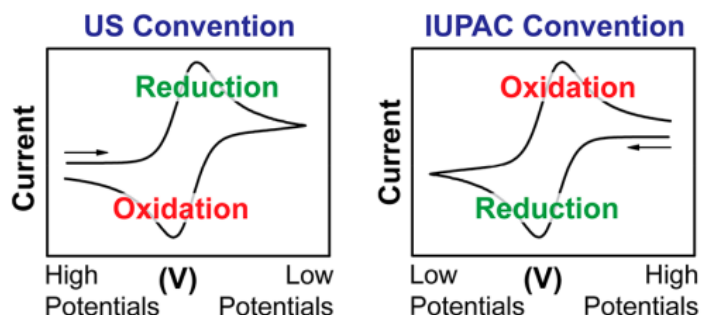


Figura 1.9 - Diferença dos voltamogramas nas convenções americana e IUPAC (figura retirada de Elgrishi *et al.*, 2017).

A equação de Nernst é responsável por representar o equilíbrio entre duas espécies num sistema voltamétrico. Esta é capaz de relacionar o potencial de uma célula eletroquímica (E) com o potencial padrão de uma espécie (E^0) e as atividades relativas dos analitos oxidados ou reduzidos. Deste modo, a equação de Nernst dá a possibilidade de prever como o sistema de compostos vai reagir ou responder a uma diferença ou mudança de concentrações das espécies ou potencial elétrodo. De modo simplificado, numa solução com Fc^+ e imaginando que o potencial $E = E^0 \approx E_{1/2}$, a equação de Nernst prevê que Fc^+ será reduzido até atingir um equilíbrio e $[\text{Fc}^+] = [\text{Fc}]$. Assim, quando uma solução de Fc^+ é lida a potenciais negativos, esta é reduzida a Fc no elétrodo (dado que este é responsável por doar eletrões), resultando numa escassez de Fc^+ na superfície do mesmo (Elgrishi *et al.*, 2017). O voltamograma resultante deste exemplo está presente na Figura 1.10.

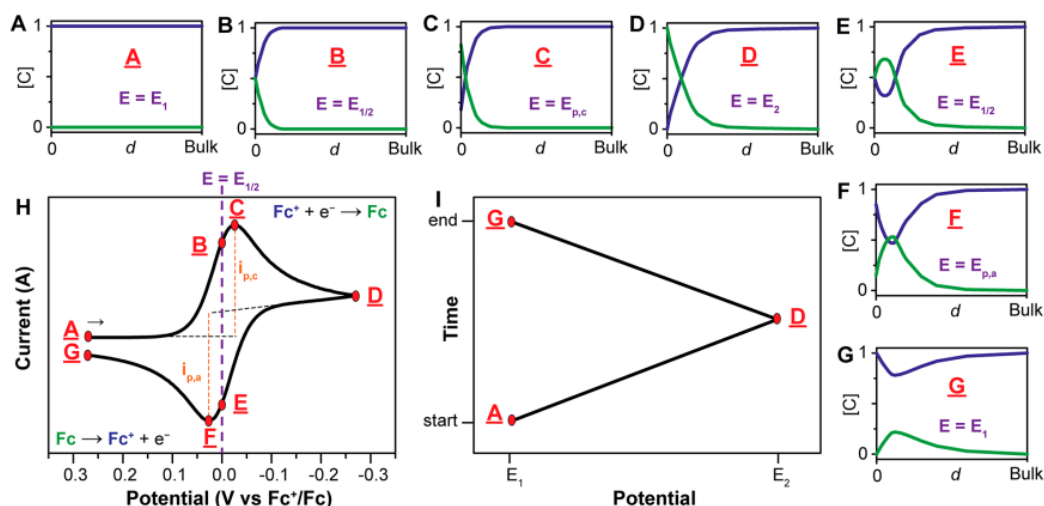


Figura 1.10 - Perfis de concentração de Fc^+ (azul) e Fc (verde), em função da distância do elétrodo (A-G). Voltamograma da reação (H). Potencial aplicado em função do tempo (I) (figura retirada de Elgrishi *et al.*, 2017).

Do ponto A ao D, a solução é lida negativamente e, por isso, existe a redução de Fc^+ a Fc , evidenciado pela evolução dos gráficos A a D. Quando a digitalização alcança o ponto D, existe troca na direção, passando a ser positiva. Deste modo, a partir deste ponto, vai-se observando uma concentração cada vez maior de $[\text{Fc}^+]$ à superfície do elétrodo (gráficos D a G), uma vez que Fc é oxidado. Nos pontos B e E, as concentrações de Fc^+ e Fc são iguais na superfície do elétrodo. Este conjunto de reações satisfazem a equação de Nernst (Elgrishi *et al.*, 2017).

1.3.1.3 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*), é uma técnica voltamétrica de amplitude diferencial larga que permite a aplicação de um potencial em forma de escada combinado com uma onda quadrada ao eletrodo de trabalho, daí o nome “*Square Wave*”. Como visível na seguinte Figura 1.11, em SWV a curva do potencial de corrente é derivada das aplicações de potenciais de altura ΔE (amplitude do pulso) que variam de acordo com a diferença de potencial E_{step} , durante o período τ . Assim, a largura do pulso (t) é representada por $\tau/2$, e a frequência do pulso é representada por $1/t$. Adicionalmente, as correntes elétricas são medidas no final de cada pulso (I_1 e I_2), sendo o sinal obtido como a intensidade do resultado de corrente diferencial (ΔI). Quando ΔI é traçado *versus* o potencial aplicado, obtém-se o voltamograma comum de um SWV (Simões & Xavier, 2017; Franklin *et al.*, 2016).

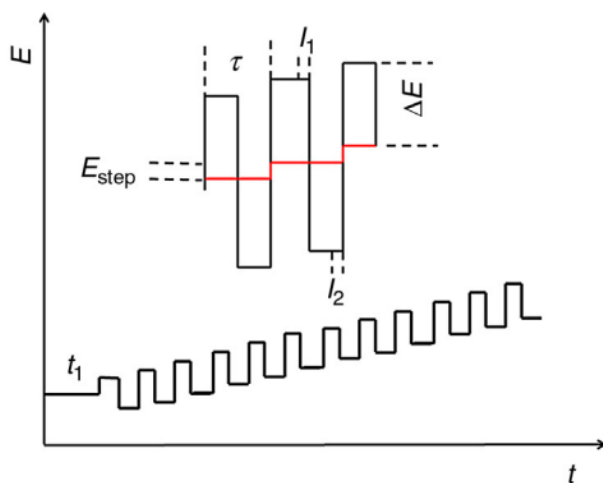


Figura 1.11 - Detalhes da aplicação de potencial em voltametria de onda quadrada e definição de parâmetros (Simões & Xavier, 2017).

Deste modo, o SWV é uma das técnicas voltamétricas mais rápidas e sensíveis, cujo objetivo é minimizar os efeitos de processos não-Faradaicos e outras correntes parasitas, melhorando significativamente a sensibilidade voltamétrica (Abeykoon & White, 2023). Estas vantagens são alcançadas devido à substituição do potencial contínuo por uma voltametria cíclica de escada, como já referido anteriormente (Deffo *et al.*, 2023).

1.3.1.4 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial, também conhecida como DPV (do inglês *Differential Pulse Voltammetry*), é uma técnica onde existe a aplicação de pulsos de potencial baixo (10 – 100 mV) com amplitude pequena (~10 ms) numa rampa linear de potencial. As correntes são medidas no início e no final da aplicação de um pulso, como evidente pelas linhas vermelhas na Figura 1.12, e é calculada a diferença dessas correntes (Venton & DiScenza, 2020). A diferença dessas correntes traçada *versus* o potencial resulta no voltamograma comumente visto para DPV (Figura 1.13) (Deffo *et al.*, 2023).

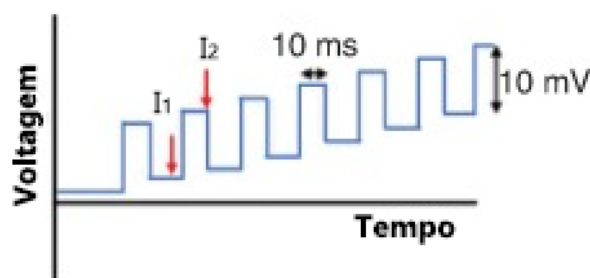


Figura 1.12 - Forma em onda da aplicação de determinada voltagem usando voltametria de pulso diferencial (as setas vermelhas indicam o início e fim de cada passo, onde as correntes são medidas) (figura adaptada de Venton & DiScenza, 2020).

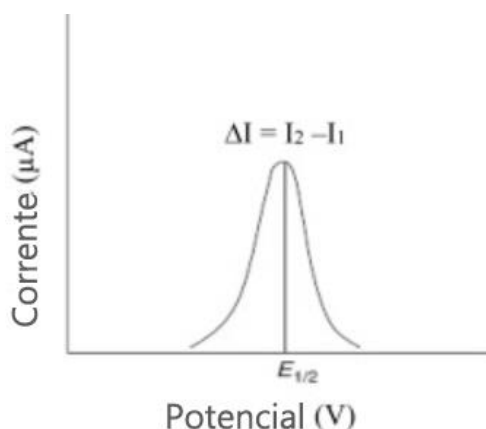


Figura 1.13 - Voltamograma típico obtido usando voltametria de pulso diferencial (figura adaptada de Deffo *et al.*, 2023).

Tal como acontece no SWV, esta técnica permite reduzir correntes parasitas/ruído, levando a uma elevada sensibilidade. Outra vantagem da DPV são os seus pequenos passos que levam a picos voltamétricos estreitos, distinguindo certos analitos que tenham potenciais de oxidação semelhantes (Venton & DiScenza, 2020).

1.3.1.5 Voltametria de varrimento linear

A voltametria de varrimento linear (LSV, do inglês *Linear Sweep Voltammetry*) é uma técnica onde o potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho aumenta linearmente ao longo do tempo, como visível na Figura 1.14a superior, tendo início num potencial, E_i , onde não existem quaisquer reações, até um potencial E onde reações de oxidação ou redução acontecem (Bontempelli & Toniolo, 2009).

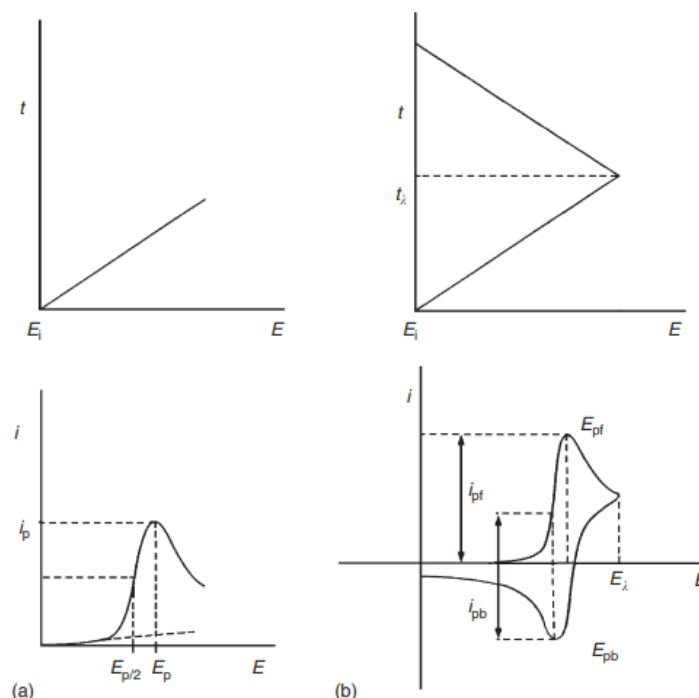


Figura 1.14 - Forma das ondas para a voltametria de varrimento linear (a) e voltametria cíclica (b) e respetivos voltamogramas (Bontempelli & Toniolo, 2009).

A corrente é lida ao longo de toda a leitura, o que resulta numa curva corrente-potencial, vulgarmente conhecida como voltamograma, com uma forma semelhante ao presente na Figura 1.14a inferior. Nesta figura, o i_p representa o pico máximo de corrente e E_p representa o valor aplicado de potencial que corresponde a i_p . $E_{p/2}$ representa o potencial para quando o pico de corrente está a metade da altura máxima ($i_p/2$). Relativamente à Figura 1.14b superior, esta representa uma LSV cujo potencial alcançou um máximo em t_λ e de seguida foi revertido e, por consequência, a forma da onda obtida resulta em duas varreduras lineares juntas. A lógica para a Figura 1.14b inferior é a mesma (Bontempelli & Toniolo, 2009).

1.3.2 Instrumentação usada em sensores eletroquímicos

- Célula eletroquímica

Em eletroquímica, as reações de oxidação-redução ocorrem num reator designado especificamente de célula eletroquímica num sistema composto por, pelo menos, dois eléctrodos em contacto com uma solução iónica designada de eletrólito. No desenvolvimento de sensores é tipicamente usado um sistema de três eléctrodos, nomeadamente o eléctrodo de trabalho (sensor), eléctrodo auxiliar e o eléctrodo de referência, tal como demonstrado na Figura 1.15.

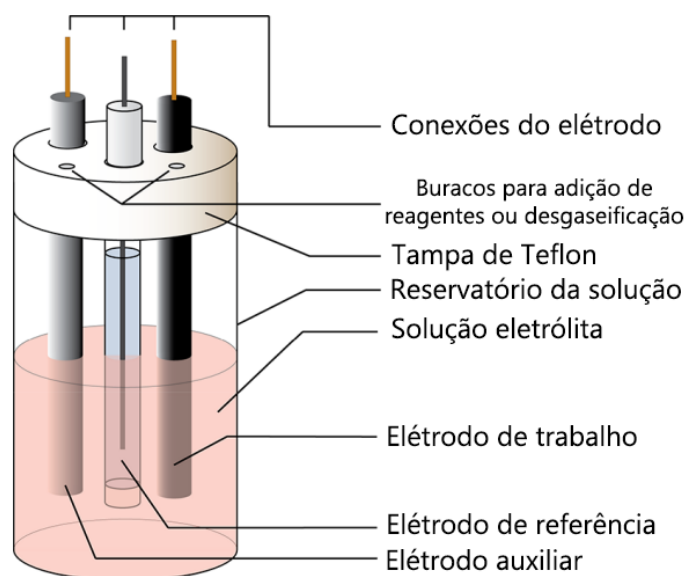


Figura 1.15 - Esquema de uma célula eletroquímica usada para determinações eletroquímicas (figura adaptada de Elgrishi *et al.*, 2017).

- Solução eletrólito

Um aspeto bastante crucial em eletroquímica é a escolha e uso de eletrólito. Esta é representada pela mistura de um sal, denominado eletrólito suporte, e um solvente que ajuda a diminuir a resistência da solução através da criação de um “caminho” para o fluxo de eletrões ou iões dentro da célula eletroquímica (Choudhary *et al.*, 2017), criando uma neutralidade eléctrica. O solvente em questão deve ser líquido a temperaturas experimentais, ser capaz de ser purificado, ser estável às reações de oxidação e redução, ser capaz de dissolver o eletrólito e analito e não degradar os mesmos. Já o eletrólito suporte deve ser solúvel no solvente, quimicamente e eletroquimicamente inerte e ser capaz de ser purificado (Elgrishi *et al.*, 2017).

- Eléctrodo

A célula mais usada em eletroquímica é constituída por um conjunto de três eléctrodos (Figura 1.15): eléctrodo de trabalho, eléctrodo auxiliar e eléctrodo de referência.

O eléctrodo de trabalho é essencialmente o eléctrodo responsável por realizar a reação eletroquímica de interesse. É imperativo que este seja constituído por um material redox inerte dentro do potencial da reação de interesse, que a superfície esteja bem limpa e que a área superficial seja bem definida. Os materiais preferidos e mais comuns neste eléctrodo são o ouro, a platina, o carbono e o mercúrio. Estes materiais diferem entre si em características como o custo, a gama de potencial (mais propenso catodicamente ou

anodicamente) e durabilidade. A Tabela 1.2 seguinte compila algumas vantagens e limitações de cada um dos materiais referidos (Kelly, 2020).

Tabela 1.2 - Limitações e vantagens de diferentes materiais usados em eléctrodos de trabalho (Kelly, 2020).

Material	Vantagens	Limitações
Platina (Pt)	• Disponível em diferentes formas (fio, prato ou tubo) • Diferentes tamanhos • Alta rigidez quando acoplado com ródio (Rh)	• Preço elevado • Potencial catódico limitado
Ouro (Au)	• Semelhante à platina • Maior potencial catódico	• Gama anódica limitada devido à oxidação da superfície do material • Preço elevado
Carbono (C)	• Várias configurações e tipos disponíveis • Bom potencial catódico • Custo reduzido	• Difícil moldagem • A qualidade varia bastante
Mercúrio (Hg)	• Gama catódica excelente • Forma amálgamas	• Gama anódica limitada • Tóxico

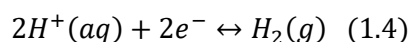
Outro aspeto importante que pode influenciar a análise eletroquímica é a presença de impurezas no solvente, as quais podem ser adsorvidas para a superfície do eléctrodo de trabalho. Estas podem ser removidas eficazmente através de um tratamento do solvente com carvão ativado (Elgrishi *et al.*, 2017). No entanto, é geralmente realizado um pré-tratamento dos eléctrodos de trabalho de modo que certas impurezas sejam removidas, dado que estas podem bloquear sítios ativos do eléctrodo e diminuir a eficiência de fluxo de eletrões. Estes pré-tratamentos são baseados em métodos de polimento mecânico, métodos térmicos e métodos eletroquímicos (Bott, n.d.).

Os pré-tratamentos de polimento mecânico são os mais comuns em eléctrodos convencionais e o modo de execução depende bastante da utilidade experimental do eléctrodo. O procedimento mais comum nestes métodos é a aplicação de material de polimento baseado em alumínio (0,05 e 0,3 μm) numa folha/superfície de tecido ou material de polimento baseado em diamante numa folha/superfície de poliamida, nas quais se vai passar o eléctrodo. Após o tempo necessário de contacto do eléctrodo com o material de polimento, este é limpo com água destilada (para tratamentos com alumínio) ou metanol/etanol (para tratamentos com diamante). De seguida os eléctrodos são colocados em metanol e são expostos a um banho de ultrassons (Bott, n.d.).

Os pré-tratamentos eletroquímicos consistem na oxidação e/ou redução eletroquímica através da aplicação de potenciais fixos ou variáveis no eletrodo de trabalho, removendo quaisquer espécies anteriormente adsorvidas ou grupos funcionais presentes na superfície. Estes potenciais são geralmente realizados em ciclo e em amplitudes positivas ou negativas elevadas. Por exemplo, os eletrodos de fibra de carbono são pré-tratados com potenciais que variam entre 0 V e +3 V a 70 Hz por 20 segundos, seguido de um potencial constante de +1,5 V durante 20 segundos (Bott, n.d.).

Os pré-tratamentos térmicos são, tal como o nome o diz, realizados a elevadas temperaturas de modo a gerar uma elevada área de superfície. Segundo o estudo de Greco *et al.* (2021), as etapas para o pré-tratamento de oxidação térmica de eletrodos Freudenberg H23 começam por sujeitar estes mesmos eletrodos a ar a 400, 450 ou 500 °C, num forno, por períodos de tempo variáveis. Durante este pré-tratamento, os eletrodos são colocados numa folha de alumínio de modo a prevenir contaminação (Greco *et al.*, 2021).

O eletrodo de referência é usado, tal como o próprio nome o diz, para haver uma referência ao aplicar um dado potencial com o auxílio de um potenciostato/galvanostato. Deste modo, é necessário que este eletrodo tenha um potencial bem definido e equilibrado. Alguns exemplos de eletrodos de referência incluem o calomel, hidrogénio, AgCl/Ag e Ag⁺/Ag. Este último é maioritariamente usado para solventes não aquosos, onde é usado um fio de prata numa solução que contém o sal Ag⁺ (AgNO₃) (Elgrishi *et al.*, 2017). O de hidrogénio, também conhecido como *standard hydrogen electrode* (SHE), é provavelmente o mais usado e conhecido, sendo composto por um sólido feito de platina (um exemplo inerte), no qual o hidrogénio é adsorvido. Este é então submerso numa solução que contém iões de hidrogénio, na qual haverá a seguinte reação 1.4 (Kelly, 2020):



Por fim, o eletrodo auxiliar é empregue com a função de completar o circuito elétrico (proveniente do potencial aplicado para a realização das reações de redução ou oxidação) presente na célula eletroquímica. Geralmente, um fio ou disco de platina ou materiais baseados em carbono podem ser usados como eletrodo auxiliar (Elgrishi *et al.*, 2017). No entanto, desde que estes sejam inertes relativamente à reação que está a ocorrer no eletrodo de trabalho, não existe nenhum material “base” para o eletrodo auxiliar (Kelly, 2020).

1.4 Nanomateriais

Os nanomateriais podem ser usados na construção de biossensores e têm um papel bastante importante no desenvolvimento dos mesmos. Devido às suas propriedades mecânicas e elétricas podem ser usados como transdutores ou modificadores de transdutores. O tamanho reduzido confere uma maior área superficial que aliado às propriedades condutoras/semicondutoras permite uma maior área de acoplação/imobilização e um aumento de sinal eletroquímico, aumentando assim a eficiência dos biossensores (Malhotra & Ali, 2018).

De uma forma geral, a nanotecnologia é definida pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA como “a criação e uso de estruturas, dispositivos, e sistemas que têm propriedades e funções novas devido ao seu tamanho pequeno” (Khare & Gokulan, 2014). Os nanomateriais têm sido recentemente uma área de bastante interesse para o controlo de moléculas tanto no corpo humano como para situações a nível ambiental, tratamento de águas residuais, agricultura, produtos alimentares, entre outros (Figura 1.16) (Singh *et al.*, 2020). Estes agrupam nanopartículas (NPs) cujo tamanho se encontra abaixo dos 100 nm em pelo menos uma das suas dimensões, o que fornece grandes vantagens a estes materiais. O seu tamanho na escala nano e a consequente elevada área de superfície de contacto resultam em propriedades físicas e químicas adequadas para aplicações em que é necessária uma grande reatividade, dureza ou até biocompatibilidade (Khan *et al.*, 2017).

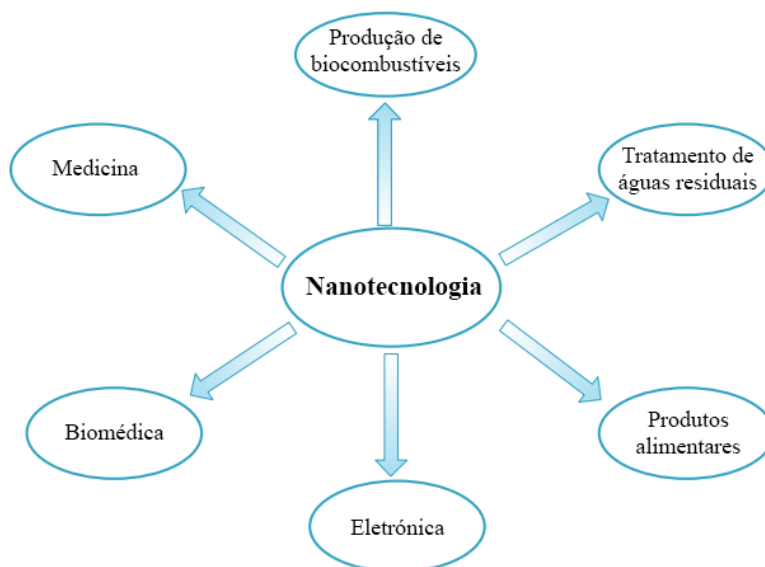


Figura 1.16 - Áreas de intervenção da nanotecnologia (figura adaptada de Singh *et al.*, 2020).

A classificação dos nanomateriais é feita tendo em conta três parâmetros: os materiais com que são feitos, a dimensão que possuem, e a sua origem (Jeevanandam *et al.*, 2018).

Materiais

Relativamente ao material base com que são produzidos, estes podem ser orgânicos (constituídos por materiais orgânicos como o micélio, lipossomas, entre outros), inorgânicos (constituídos por metais ou óxidos de metal), baseados em carbono (constituídos por fibra de carbono ou “*carbon black*”), e baseados em materiais compósitos (constituídos por uma junção de dois ou mais dos nanomateriais listados anteriormente) (Jeevanandam *et al.*, 2018).

Dimensão

A dimensão dos nanomateriais dependem da quantidade de dimensões que possuem na escala nano, isto é, se todo o seu plano espacial em x, y e z está dentro dos 1 e 100 nm ou não. Deste modo, podem ser classificados em zero dimensões, uma dimensão, duas dimensões ou três dimensões. Nanomateriais com zero dimensões possuem todo o seu plano espacial dentro dos 1 e 100 nm, os de uma dimensão têm um plano espacial fora da nanoescala, os de duas dimensões possuem dois planos espaciais fora, e os de três dimensões possuem todos os planos fora (Saleh & Gupta, 2016).

Origem

Segundo Erdem *et al.* (2021), os nanomateriais podem ter diferentes origens, sendo estas naturais, racionais/acidentais ou sintéticas. Os nanomateriais naturais são aqueles produzidos naturalmente por espécies biológicas através de fenómenos naturais. Os nanomateriais racionais ou acidentais são aqueles que foram construídos com a intervenção humana, seja esta intencional ou acidental. Os nanomateriais sintéticos, também conhecidos como nanomateriais projetados, são produzidos através de reações físicas, químicas, biológicas ou uma mistura destas (Jeevanandam *et al.*, 2018) (Erdem *et al.*, 2021).

Na construção de sensores e biossensores, os nanomateriais à base de carbono como por exemplo nanotubos de carbono (NTC), grafeno e *quantum dots* (QDs), e os nanomateriais metálicos e óxidos metálicos são amplamente usados para obtenção de uma maior eficiência, embora o custo económico e ambiental também certamente aumentará. Contudo, a utilização de nanomateriais poderá nem sempre ser vantajoso em termos analíticos sendo necessário um estudo prévio dos seus efeitos no sinal analítico.

1.4.1 Nanomateriais à base de carbono

1.4.1.1 Nanotubos

Os nanotubos (geralmente de carbono) são nanomateriais de uma dimensão, dado que possuem apenas uma das suas dimensões acima dos 100 nm. Algo importante de referir é a diferença entre os nanotubos e os nanofios, que, embora sejam ambos nanomateriais representativos de uma dimensão, possuem diferenças na estrutura. Os NTC possuem uma estrutura mais complexa que os nanofios, sendo constituídos por camadas de grafeno enroladas de modo a formar tubos ocos, como visível na Figura 1.17 seguinte. Os NTC podem ser formados por múltiplas camadas de grafeno (a), ou por apenas uma única camada de grafeno (b) (Maruyama, 2021).

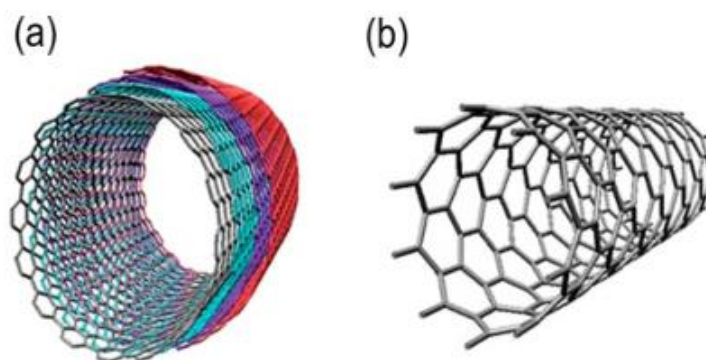


Figura 1.17 - Estrutura de nanotubos de carbono de camada múltipla (a) e de camada única (b) (figura retirada de Maruyama, 2021).

De um modo geral, os NTC são bastante empregues nas áreas de biologia, química e física devido à cavidade oca que pode atuar como “reservatório” para aplicações como quimioterapia, transportadores de drogas, catálise, separação molecular, entre outras (Shaban *et al.*, 2022). A nível eletroquímico, os NTC são dos materiais de suporte mais promissores para a modificação de superfície de eléctrodos, graças às propriedades únicas de estabilidade química, condutividade eléctrica, elevada razão superfície-volume e grande capacidade de adsorção (Cesarino *et al.*, 2013).

No estudo de Cesarino *et al.* (2013) foi feita a caracterização e aplicação de NTC de múltiplas camadas com NPs de antimónio num eléctrodo de compósito de parafina, para a deteção de TMP e sulfametoxazol em amostras de água. Para tal foi usado quatro tipos de eléctrodos de trabalho em diferentes amostragens: Eléctrodo de Carbono Vítreo (GCE, do inglês *Glassy Carbon Elettrode*), parafina/grafite, parafina/NTC de múltiplas camadas, e parafina/NTC de multiplas camadas com NPs de antimónio. O eléctrodo de referência foi Ag/AgCl/KCl e o auxiliar de prata. Os resultados obtidos, presentes na Figura 1.18, demonstraram que o eléctrodo de parafina/NTC de múltiplas camadas com NP de antimónio (a) demonstrou um sinal analítico superior aos restantes. Isto, por consequência, demonstra a capacidade dos nanomateriais no aumento do sinal e melhoria de resposta nos biossensores (Cesarino *et al.*, 2013).

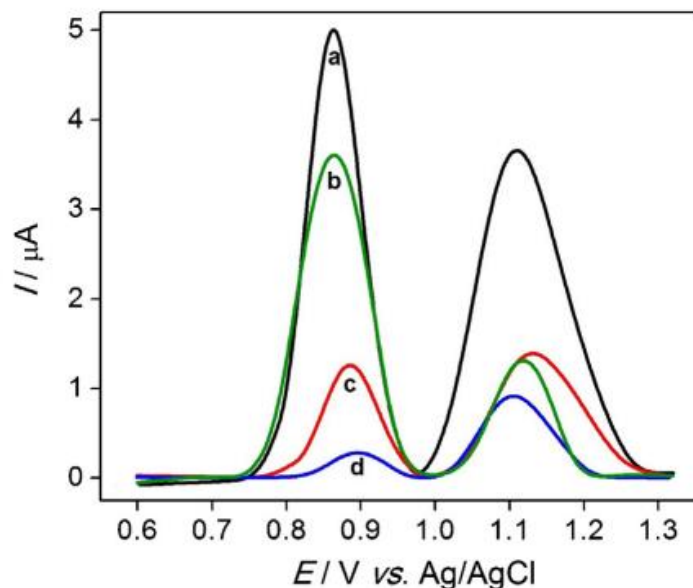


Figura 1.18 - Voltamogramas obtidos em parâmetros otimizados para os seguintes elétrodos: (a) parafina/nanotubos de carbono de múltiplas camadas com nanopartículas de antimônio; (b) parafina/nanotubos de carbono de múltiplas camadas; (c) elétrodo de carbono vítreo; (d) parafina/grafite (figura retirada de Cesarino *et al.*, 2013).

1.4.1.2 Grafeno

Recentemente, o grafeno tem dominado o interesse científico para a produção de sensores e biossensores devido às suas características únicas. Trata-se de um material que tem o formato de uma folha plana constituída por átomos de carbono e com configuração eletrónica responsável pela elevada área superficial ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, maior que a da grafite ($10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e dos NTC ($1315 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)), grande força mecânica (cerca de 200 vezes maior que a do aço), grande condutividade elétrica e térmica, bem como elevada elasticidade. O grafeno pode ser usado em biossensores na forma de óxido de grafeno ou óxido de grafeno reduzido (RGO, do inglês *Reduced Graphene Oxide*), os quais fazem parte da família do grafeno e são os mais usados. Adicionalmente, e devido à sua forma planar e estrutura química, o grafeno é um material que possui uma elevada sensibilidade a mudanças no ambiente circundante ao mesmo, o que é um fator fundamental para áreas de sensoramento. Esta elevada sensibilidade é devido ao contacto direto que os carbonos da estrutura deste material têm com os analitos, tornando-o num material com maior sensibilidade que nanofios de silicone ou mesmo NTC (Justino *et al.*, 2017).

Num estudo realizado por Yu *et al.* (2016), foi usado Grafeno Dopado com Nitrogénio (NG, do inglês *Nitrogen-Doped Graphene*) para o aumento da sensibilidade da deteção de hexaclorobenzeno (HCB). Este composto químico é um composto organoclorado lipofílico que foi muito usado como revestimento de sementes contra doenças provocadas por fungos entre os anos 40 e 70, mas que, devido à sua elevada toxicidade e bioacumulação, foi incluído na lista de poluentes orgânicos persistentes na Convenção de Estocolmo, dado que foi confirmado como carcinógeno animal e potencial causador de danos em órgãos humanos (Yu *et al.*, 2016).

Para a deteção destes compostos foi usado um GCE modificado. Após pré-tratamento de polimento mecânico (já referido), o eletrodo em questão foi modificado conforme visível na Figura 1.19. Primeiramente, o eletrodo foi incubado em NG durante 30 minutos para se obter NG/GCE, o qual foi marcado como (NG/CS)_{0.5}/GCE. Este último foi, de seguida, incubado numa solução de quitosano (CS) e NG durante 30 minutos para se obter (NG/CS)_{1.5}/GCE. Repetindo estes passos mais duas vezes obtém-se (NG/CS)_{3.5}/GCE (Yu *et al.*, 2016).

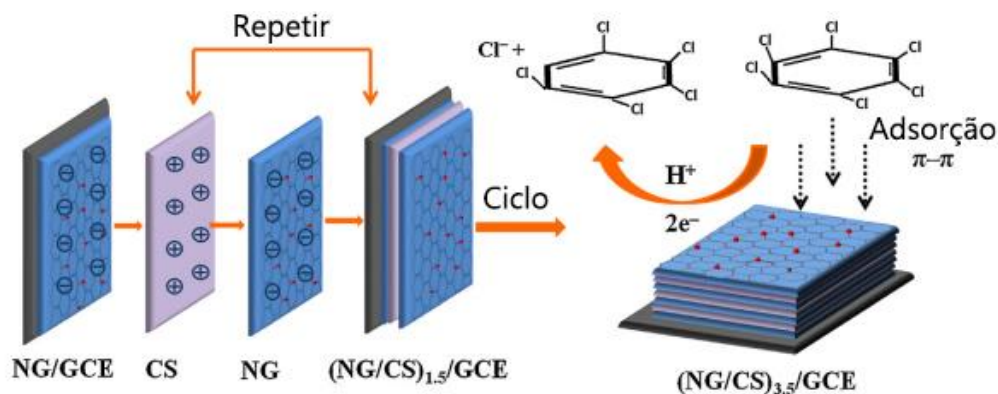


Figura 1.19 - Esquema de preparação de (NG/CS)_{3.5}/GCE (figura adaptada de Yu *et al.*, 2016).

Os resultados, presentes na Figura 1.20, demonstraram que existe um maior sinal para os eletrodos (NG/CS)_{3.5}/GCE (c) e (G/CS)_{3.5}/GCE (b), evidente pelos picos de redução superiores comparativamente ao GCE não modificado (a). A razão destes resultados está relacionada com o facto do grafeno e o NG terem uma área superficial superior e uma condutividade ótima que contribuem para que existam maior número de locais catalíticos ativos, os quais são condutivos à redução do HCB. É possível também observar que comparando os picos obtidos entre (NG/CS)_{3.5}/GCE (c) e (G/CS)_{3.5}/GCE (b), é evidente que o (NG/CS)_{3.5}/GCE (c) tem um pico ligeiramente superior. Isto pode ser devido aos efeitos de dopagem do nitrogénio e a mudança na densidade dos estados eletrónicos, os quais podem facilitar a redução eletroquímica do HCB. Adicionalmente, os resultados obtidos deste estudo demonstraram uma intensidade de corrente linear entre as concentrações 3 µg/L a 10 mg/L de HCB, com limite de deteção de 1,72 µg/L e sensibilidade de 1,16 µA/(mg/L cm²) (Yu *et al.*, 2016).

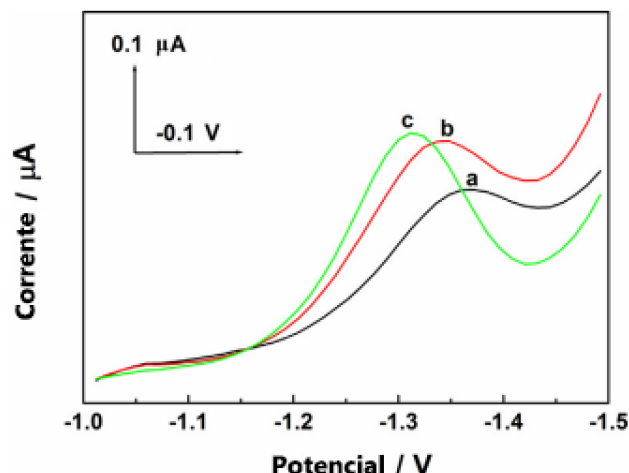


Figura 1.20 - Resultados obtidos usando voltametria de pulso diferencial para uma solução de 3 mg/L de hexaclorobenzeno usando um (a) GCE não modificado; (b) (G/CS)_{3.5}/GCE; e (c) (NG/CS)_{3.5}/GCE (figura adaptada de Yu *et al.*, 2016).

1.4.1.3 QDs

QDs são nanomateriais representativos de zero dimensões, isto é, possuem todas as suas dimensões dentro da escala nano. Devido às suas propriedades ótico-eletrónicas excelentes, estes são largamente usados em ciência dos materiais, ciência fotovoltaica, catálise, energia, biomedicina e, acima de tudo, biossensores. Dado que são materiais de zero dimensões, o seu formato habitual passa por nanopartículas esféricas ou quase esféricas com diâmetro inferior a 100 nm (Wang *et al.*, 2020). No entanto, o diâmetro ideal encontra-se entre 2 e 6 nm para o aumento da intensidade do sinal analítico (Wong *et al.*, 2020).

No estudo de Wong *et al.* (2020), foram usados QDs de negro de carbono (também conhecido como Printex 6L Carbon, ou *carbon black*) devido ao baixo custo dos materiais de carbono e propriedades eletroquímicas favoráveis, juntamente com QDs de telureto de cádmio num filme de poli(3,4-etilenodioxitiopeno) poliestireno sulfonato (PEDOT:PSS) para a deteção do antibiótico amoxicilina. Foram empregues GCE (pré-tratados com polimento mecânico) e foi feita uma solução de negro de carbono com água ultrapura, PEDOT:PSS e QDs para a formação do sensor. Os resultados demonstraram que em condições experimentais otimizadas, o sensor demonstrou alta sensibilidade, repetibilidade e estabilidade para concentrações de amoxicilina entre 0,90 e 69 μmol/L e um limite de deteção inferior de 50 nmol/L. Como é possível observar pela Figura 1.21 abaixo, a presença de QDs (c) mostrou uma resposta eletroquímica mais acentuada do que na ausência dos mesmos, demonstrando a capacidade de aumento do sinal analítico destes nanomateriais (Wong *et al.*, 2020).

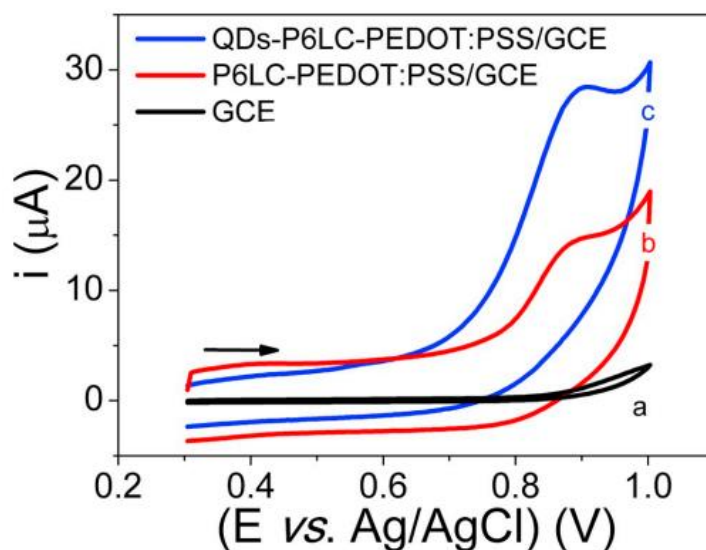


Figura 1.21 - Efeito dos *Quantum Dots* na resposta eletroquímica. QDs = *Quantum Dots*; P6LC = negro de carbono; GCE = elétrodo de carbono vítreo. (Figura adaptada de Wong *et al.*, 2020).

1.4.2 Nanomateriais metálicos

1.4.2.1 Nanopartículas de ouro

As NPs de ouro têm vindo a obter uma atenção crescente devido às suas capacidades de biocompatibilidade, boa condutividade térmica e elétrica, estabilidade química e razão volume/superfície elevada. Comparativamente às partículas de ouro, que possuem uma cor amarelada e são inertes, as NPs de ouro têm uma cor vermelho-vinho e possuem capacidades antioxidantes, com tamanhos que podem variar entre 1 nm e 8 μm e diferentes formatos: esféricas, tetraédricas, nanoprismas, octaedros, irregular, entre outros (Nafisi & Maibach, 2017). Estes nanomateriais podem ser produzidos através de diferentes métodos, tais como redução ou redução fotoquímica (Petrucci *et al.*, 2022). Vários estudos já demonstraram que a síntese verde destas NPs usando extratos de planta é mais vantajosa como agentes redutores (Khare *et al.*, 2019). Geralmente, estes nanomateriais são usados para modificação de elétrodos eletroquímicos para aumentar a sua área superficial para a absorção e consequente redução catalítica dos analitos, de modo a gerar sinais elétricos (Wang *et al.*, 2013).

Num estudo de Wu *et al.* (2017), foi elaborado um biossensor (aptasensor) eletroquímico de RGO com NPs de ouro baseado em nanocompósitos para a deteção de bifenilos policlorados. Este grupo de compostos químicos é constituído por cerca de 209 compostos com estrutura química semelhante e são muito usados em várias aplicações industriais. No entanto, vários efeitos adversos à saúde pública são observados quando se empregam estes compostos: neurotoxicidade, imunotoxicidade, efeitos carcinogénicos ou até toxicidade reprodutiva. Dos 209 compostos referidos, o bifenilo policlorado mais tóxico é o PCB77, o qual está presente em baixas concentrações no ambiente (Wu *et al.*, 2017).

O RGO foi preparado com um auxílio de moinho de bolas a 450 rpm durante 20 horas para se obter óxido de grafeno, o qual vai ter o pH ajustado para 10 com NaOH seguida de uma adição de vitamina C. A solução resultante foi centrifugada para se obter RGO. Já as NPs de ouro foram obtidas através do método de crescimento induzido de semente. A junção e mistura de ambos os compostos durante 30 minutos resulta em RGO-NPs de ouro. Antes de se modificar a superfície do eletrodo de ouro, é feito um pré-tratamento de polimento mecânico, ao qual se vai adicionar a solução anteriormente feita e aptâmero (Ap), finalizando assim a modificação do eletrodo (Wu *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que entre os diferentes biossensores RGO-AuNP-Ap/Au, AuNP-Ap/Au e Ap/Au, o que tem maior sensibilidade é o de RGO-AuNP-Ap/Au com $226,8 \mu\text{A cm}^{-2}$, comparativamente a $147,2$ e $1,07 \mu\text{A cm}^{-2}$ para AuNP-Ap/Au e Ap/Au, respetivamente. Adicionalmente, a detecção limite do PCB77 foi de $0,1 \text{ pg/L}$. A performance superior oferecida pelos biossensores modificados é devida à elevada área superficial oferecida tanto pelas NPs de ouro como o RGO. Não só isso, mas estes nanomateriais têm propriedades de condutividade elétrica únicas, o que permite uma taxa de transferência de eletrodos superior, resultando num melhor sinal (Wu *et al.*, 2017).

1.4.2.2 Óxidos metálicos

As nanopartículas de metal e os seus óxidos são muito usados para química sensorial, mais propriamente para determinação de níveis de poluição do ar, mas que devido ao seu baixo custo, estabilidade e resposta rápida, são empregues em sensores para a monitorização de emissões para o ambiente, tratamento de águas. Mais recentemente, as NPs de óxidos metálicos têm sido usadas para monitorização de poluentes emergentes como compostos orgânicos voláteis, gases inflamáveis, entre outros (Hassan *et al.*, 2021). Dos óxidos metálicos já usados para aplicações de sensoriamento, existem, por exemplo, óxidos de ferro, óxidos de titânio, óxidos de zircónio, óxidos de cério, óxidos de zinco e óxidos de estanho (Willner & Vikesland, 2018).

No estudo de Ahmad *et al.* (2017), o objetivo passou pela produção de um sensor capaz de medir os níveis de glucose no sangue sem recorrer ao uso de enzimas, dado que estas possuem algumas limitações e dificuldades: purificação complicada da biomolécula, elevado custo de fabricação e pouca repetibilidade devido à desnaturação. Assim, de modo a dar resposta a estas limitações, sensores eletroquímicos não-enzimáticos têm atraído interesse para o sensoriamento de biomoléculas, com o objetivo de alcançar um bom custo de fabricação, alta repetibilidade e estabilidade. Mais propriamente, os materiais mais promissores são as nanoestruturas híbridas. Deste modo, neste estudo foi fabricado um sensor de glucose não-enzimático com nanobastões de óxido de zinco (ZnO NRs, do inglês *Zinc Oxide Nanorods*) alinhados verticalmente num eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor (FTO, do inglês *Fluorine-doped Tin Oxide*) e decorado com óxido de cobre (CuO). O ZnO é um nanomaterial com baixo custo e toxicidade negligível, mostrando ser um bom material para sensores enzimáticos e não-enzimáticos. Adicionalmente, a sua síntese é simples e a uma baixa temperatura, formando diferentes morfologias com propriedades óticas e características elétricas excelentes (Ahmad *et al.*, 2017).

Os resultados deste estudo demonstraram, como visível pela Figura 1.22, que a modificação do elétrodo de FTO com ZnO NRs e CuO resultaram num aumento do sinal. Para o elétrodo FTO sem qualquer modificação e para o ZnO NRs/FTO, a adição de 0,1 mM de glucose não provocou uma oxidação relevante quando comparado aos elétrodos modificados com CuO. Estes últimos demonstram um pico bem definido por volta dos +0,62 V na presença de glucose. Quanto maior a concentração dessa glicose, maior o sinal obtido, no caso apresentado. A possibilidade da deteção de glucose através de um biossensor não-enzimático acontece devido à oxidação da glucose durante a conversão do Cu(II) a Cu(III). Quando a glucose é oxidada a gluconolactona, o Cu(II) é oxidado a Cu(III) e age como um sistema de entrega de eletrões, como visível pela Figura 1.23 (Ahmad *et al.*, 2017).

Adicionalmente, os resultados demonstraram que o elétrodo de CuO-ZnO NRs/FTO tem uma alta sensibilidade ($2961,7 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$), limite inferior de deteção de $0,40 \mu\text{M}$ e um tempo de resposta baixo de 2 segundos (Ahmad *et al.*, 2017).

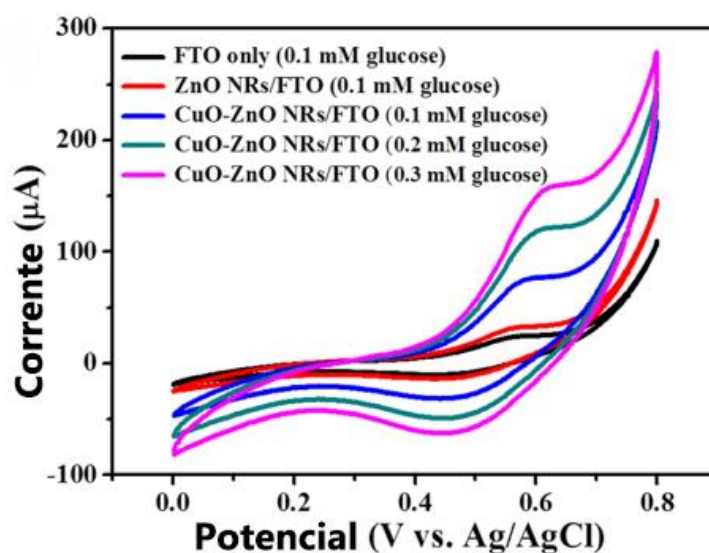


Figura 1.22 – Voltametrias cíclicas obtidas para diferentes elétrodos em solução de glucose com concentrações entre 0,1 e 0,3 mM (figura adaptada de Ahmad *et al.*, 2017).

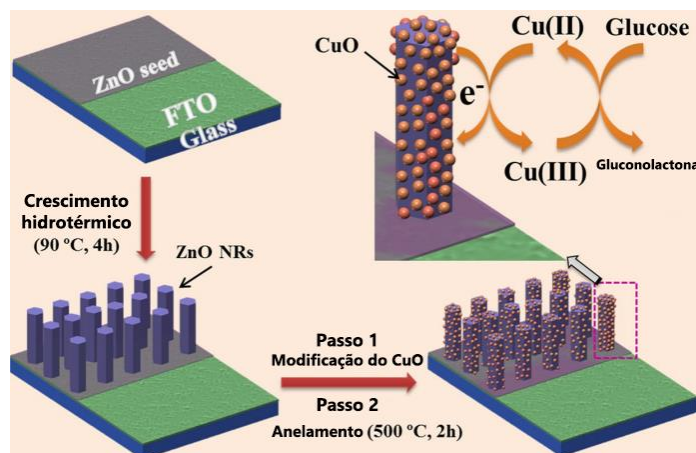


Figura 1.23 – Ilustração esquemática sobre o funcionamento de deteção de glucose do biossensor não-enzimático (figura adapta de Ahmad *et al.*, 2017).

1.4.3 Outros nanomateriais e aplicações

Embora tenham sido dados alguns exemplos de nanomateriais que podem ser usados em biossensores, existe uma grande variedade de outras alternativas como, por exemplo, as estruturas orgânicas de metal (conhecidas na literatura inglesa como MOFs, *Metal Organic Frameworks*), nanofolhas, nanoesferas, filmes, entre outros. A Tabela 1.3 seguinte compila diferentes estudos para diferentes tipos de nanomateriais usados nos biossensores.

Tabela 1.3 - Aplicações de diferentes tipos de nanomateriais em diferentes áreas.

Nanomaterial	Área de aplicação	Analito	Gama de deteção	Limite deteção inferior	Referência
MOF	Biomédica	<u>Biomarcadores tumorais</u> (Mapeamento de células tumorais usando ZIF-8 ¹)	0,01 – 0,3 (mM)	9,2 µM	Yu <i>et al.</i> (2021)
		<u>Fenóis</u> (Mapeamento da atividade oxirredutase dos fenóis usando MOFs)	0,002 – 0,6 (mM)	6,1 µM	Li <i>et al.</i> (2020)
	Ambiente	<u>Metais pesados</u> (Remoção de metais pesados de corpos aquáticos usando ZIF-8 ¹)	0,015 – 0,1 (mM)	9,8 µM	Chen <i>et al.</i> (2017)
Nanofolhas	Ambiente	<u>Metais pesados</u> (Deteção de Hg ²⁺ em águas usando nanofolhas de TaS ₂ ²)	Máx. 201° / RIU*	1 pM	Yue <i>et al.</i> (2022)
	Biomédica	<u>Neurotransmissores</u> (deteção de dopamina usando nanofolhas de AuMoS ₂ ³)	0,5 – 350 µM	0,2 µM	Lu <i>et al.</i> (2021)
NP	Ambiente	<u>Anti-inflamatórios</u> (ácido acetilsalicílico em amostras de água usando rGO/AuNPs ⁴)	0,88 – 2,80 µM	0,26 µM	Prado <i>et al.</i> (2017)
Grafeno	Ambiente	<u>Antibióticos</u> (deteção de metronidazol em amostras de água de lago usando GCE/AgNPs-grafeno ⁵)	0,05 – 10 µM 10 – 4500 µM	28 nM	Li <i>et al.</i> (2016) Torrinha <i>et al.</i> (2020)
		<u>Anti-inflamatórios</u> (deteção de Diclofenac em amostras de água de lago usando GCE/grafeno-PDDA ⁶)	20 – 100 µM	0,609 µM	Okoth <i>et al.</i> (2015) Torrinha <i>et al.</i> (2020)

Imunossensor para a deteção de fármacos como contaminantes emergentes

NTC	Ambiente	<u>Antibióticos</u>	0,1 – 0,7 μM	0,031 μM	Cesarino <i>et al.</i> (2013)
		(deteção de TMP em amostras de água natural usando CPE (NTCCM-SbNPs ⁷))			Torrinha <i>et al.</i> (2020)

*graus por unidade de índice refrativo; ¹estrutura zeolítica de imizadolato-8; ²sulfureto de tântalo(IV); ³ouro e dissulfeto de molibdénio; ⁴óxido de grafeno reduzido/nanopartículas de ouro; ⁵elétrodo de carbono vítreo/nanopartículas de prata-grafeno; ⁶elétrodo de carbono vítreo/grafeno-ácido poli(2,6-piridinedicarboxílico); ⁷nanotubos de carbono de camada múltipla-nanopartículas de antimónio.

1.5 Objetivos

O principal objetivo desta dissertação consistiu no desenvolvimento e caracterização de um biossensor eletroquímico para a deteção de fármacos que sejam considerados poluentes emergentes. Para tal, e mais especificamente, foi selecionado o desenvolvimento de um imunossensor para a deteção de TMP, ou seja, um biossensor que utiliza como elemento transdutor um eléctrodo, e como biorreceptor anticorpos seletivos ao TMP e que se ligam ao mesmo efetuando a sua deteção, originando um sinal analítico processável e quantificável.

Adicionalmente, outros objetivos igualmente importantes consistiram na otimização dos parâmetros experimentais para a construção e o desenvolvimento de um biossensor que permita obter uma resposta exata, precisa, portátil e de baixo custo. Esses parâmetros passam pela escolha do eléctrodo de trabalho adequado à deteção pretendida, efetuado pelo estudo do efeito da variação da concentração de TMP na solução, bem como o estudo da concentração, tempo de incubação e volume do anticorpo presente na superfície do eléctrodo de trabalho. Deste modo, após a otimização destes parâmetros, foi efetuada a validação do desempenho do biossensor, avaliando-se a repetibilidade, limites de deteção e quantificação, sendo posteriormente aplicado para análise de TMP em amostras de peixe.

2 Procedimento experimental

2.1 Reagentes, equipamentos e soluções

No decorrer do trabalho, utilizaram-se os seguintes reagentes adquiridos comercialmente: cloreto de sódio (VWR Chemicals, Alemanha), dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato de potássio trihidratado, trimetoprim (TMP) e metanol (Sigma-Aldrich, Alemanha), ácido sulfúrico (96% Fluka, Alemanha), N-hexano (Carlo Erba, Espanha), metanol (Riedel-de-Haen, Alemanha). Foi ainda obtido o anticorpo Anti-TMP policlonal, e um kit ELISA que contém reagentes necessários para a construção do imunoensaio (*MyBioSource, Catalog # MBS286552, EUA*).

A solução mãe de TMP de 1 mM foi preparada através da dissolução da respetiva forma sólida do fármaco em metanol. Esta solução foi posteriormente diluída para a concentração de 10 μ M usando solução tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*) 0,1 M, pH 7,4, preparada através da mistura dos sais dihidrogenofosfato de potássio e hidrogenofosfato de potássio trihidratado.

Utilizaram-se como suporte na preparação de soluções e ensaios experimentais diversos equipamentos tais como, medidor de pH Crison micropH2002 (Espanha), placa agitadora Yellow Mine (MST, Alemanha), balança analítica com precisão 0,00001 g (Mettler Toledo, Suíça) e centrífuga Thermo Scientific Megafuge 16R (Alemanha).

Para o pré-tratamento dos elétrodos foram usadas soluções de *micropolish* de alumina com 0,3 e 0,05 μ m de diâmetro. Para o pré-tratamento eletroquímico foram usadas soluções de ácido sulfúrico 1 M.

2.2 Elétrodos e sistema eletroquímico

Os ensaios eletroquímicos foram realizados no potencióstato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT128N controlado com o programa General Purpose Electrochemical System (GPES) versão 4.9 Eco Chemie B.V (Países Baixos).

Um sistema convencional de 3 elétrodos composto pelo eléctrodo de trabalho e eléctrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3 M) foi usado inicialmente. Para efeitos de miniaturização da célula eletroquímica, optou-se posteriormente por utilizar uma mina de grafite (0.7 mm diâmetro, *Rotring®*) e por uma agulha de aço inoxidável como contra eléctrodo (ou eléctrodo auxiliar) e eléctrodo de referência, respetivamente. Este sistema foi numa etapa seguinte simplificado para um sistema de dois elétrodos, sendo o sistema composto unicamente por um eléctrodo de trabalho e por um GCE usado simultaneamente como contra eléctrodo e eléctrodo de referência. Este último foi posteriormente eleito/selecionado para a realização do imunossensor.

Para a otimização do sistema eletroquímico, diversos elétrodos frequentemente usados na construção de sensores foram testados de modo a selecionar o eléctrodo de trabalho mais adequado para a determinação de TMP, nomeadamente: grafite pirolítica (PyrGE, 3 mm diâmetro), GCE (3 mm diâmetro), minas de grafite (PGE, 2 mm diâmetro, BIC), elétrodos de diamante dopados com boro (BDDE, do inglês *Boro-Doped Diamond Electrode*, 3 mm diâmetro) e papel de fibra de carbono (CP, 0,19 mm espessura, Toray). Relativamente a este último eléctrodo, a estrutura consistia numa área de aproximadamente 2 x 0,7 cm, estando uma das extremidades foi envolto papel de alumínio ou fita de cobre servindo de contacto,

sendo este último preferível, uma vez que facilita a conexão. Estes eléctrodos estão representados na seguinte Figura 2.1.

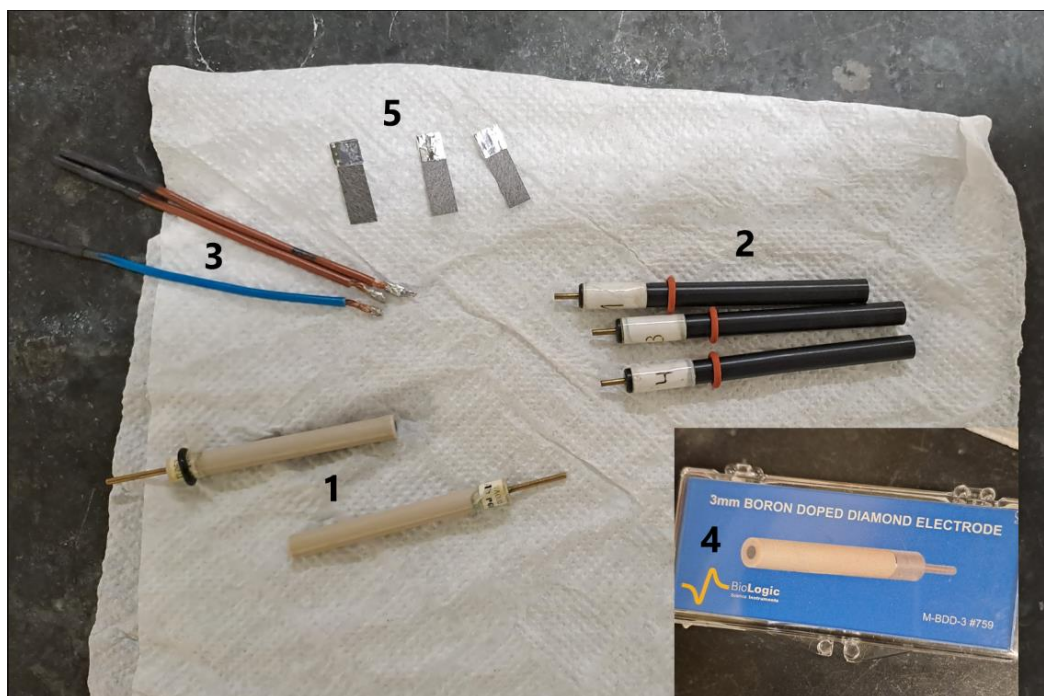


Figura 2.1 - Diferentes eléctrodos testados (1 – Grafite pirolítica, 2 – Carbono vítreo, 3 – Mina de grafite, 4 – Diamante dopado com boro, 5 – Papel de fibra de carbono).

2.2.1 Seleção do eléctrodo de trabalho

Os diferentes eléctrodos seleccionados foram comparados de acordo com o sinal electroquímico obtido para o TMP através da técnica voltametria de onda quadrada (SWV). Previamente, cada eléctrodo foi pré-tratado por meios mecânicos e/ou electroquímicos. Concretamente, os eléctrodos PyrGE, GCE e PGE foram inicialmente limpos mecanicamente através do polimento da superfície com *micropolish* de alumínio 0,3 μm durante 2 minutos, passando por água desionizada e repetindo-se o procedimento usando *micropolish* de alumínio 0,05 μm . Para uma melhor remoção dos resíduos, os eléctrodos foram imersos em etanol num *ependorf* de 1,5 mL e levados aos ultrassons por 2 minutos. Em seguida procedeu-se ao pré-tratamento electroquímico aplicando-se CV de -0,2 a +1,0 V a 100 mV/s por 50 ciclos em 0,5 M H_2SO_4 . O eléctrodo BDDE foi apenas pré-tratado via electroquímica em meio ácido (0,5 M H_2SO_4). Neste caso, amperometria foi usada aplicando-se um potencial de +3 V seguido de -3 V por 60 segundos cada para conferir terminações H à superfície do eléctrodo. De forma semelhante terminações O foram também conferidas noutra eléctrodo BDDE aplicando amperometria -3 V seguida de +3 V por 60 segundos cada. O eléctrodo CP foi apenas tratado por via electroquímica através de CV nas condições descritas acima.

As análises SWV do TMP com cada eléctrodo foram feitas em 10 mL de solução tampão PBS 0,1 M a pH 7,0 de 0 a 1,5 V com os seguintes parâmetros: frequência 20 Hz, degrau de potencial 0,01 V e amplitude 0,02 V. Estas análises consistiram na leitura de um branco e de 10 μM TMP em triplicado, para cada eléctrodo.

2.2.2 Miniaturização da célula eletroquímica

O sistema de deteção composto por três elétrodos e a célula eletroquímica (célula onde ocorre reações e determinações eletroquímicas) foram miniaturizados. Para o efeito, um tubo Falcon® de 50 mL foi cortado usando-se a parte cónica inferior como célula eletroquímica (Figura 2.2). O volume de eletrólito usado nos ensaios seguintes foi de 5 mL.



Figura 2.2 - Miniaturização da célula eletroquímica usando um Falcon®.

2.3 Construção do imunoensaio e deteção eletroquímica

Foi delimitada a área do elétrodo de trabalho (elétrodo CP, $A = 0,16 \text{ cm}^2$), sendo posteriormente biomodificada com 10 μL de anticorpo anti-TMP policlonal (concentração de 100 $\mu\text{g/L}$), procedendo-se à incubação durante 20 minutos. Este passo é realizado através da adição do volume definido na superfície do elétrodo com o auxílio de uma micropipeta, formando uma gota na extremidade, como se pode observar na Figura 2.3. Procede-se à adição de 5 mL de tampão PBS à célula eletroquímica e à conexão dos elétrodos. De seguida, adiciona-se um volume constante de TMP (100 μL) obtendo-se um sinal eletroquímico diretamente proporcional às concentrações crescentes obtidas (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 μM) sendo efetuado o método de adição padrão.

As medições eletroquímicas foram efetuadas por SWV, entre 0,3 V e 1,5 V, a uma velocidade de varrimento de 0,375 V/s (frequência de 25 Hz, degrau de potencial de 0,015 V). A posição do pico correspondente à medição de TMP surgia a aproximadamente + 0,9 V. A densidade de corrente (j) foi calculada de acordo com o valor obtido para a intensidade de pico (i_p) dividido pela área do elétrodo.



Figura 2.3 - Biomodificação eléctrodo de papel de fibra de carbono com anticorpo anti-trimetoprim policlonal.

2.4 Preparação das amostras alimentares

A preparação da amostra alimentar consistiu nas seguintes etapas, referentes ao procedimento indicado pelo fornecedor (*MyBioSource Catalog # MBS286552*, EUA). A amostra foi inicialmente homogeneizada, seguindo-se a pesagem de $2 \pm 0,05$ g para um tubo de centrifugação e adição de 6 mL de metanol e 2 mL de N-hexano. Agitou-se o tubo de centrifugação durante 5 minutos e levou-se à centrifugação durante 10 minutos, a 4000 rpm, 20 °C. Após a centrifugação, obteve-se uma fase superior maioritariamente constituída por gorduras e uma fase inferior onde o analito de interesse (TMP) está presente. A fase superior foi removida, sendo transferidos 0,5 mL da fase inferior para tubo Eppendorf. Procedeu-se à evaporação da amostra com auxílio de nitrogénio gasoso e após a remoção dos compostos voláteis, foram adicionados 0,4 mL de solução de redissolução e 0,5 mL de N-hexano, seguida de uma agitação vigorosa durante 1 minuto, no vórtex. Procedeu-se a uma subsequente centrifugação a 4000 rpm, durante 5 minutos, a 20 °C. Por fim, removeu-se a fase superior líquida e armazenou-se o volume de sobrenadante restante a 4 °C, até serem efetuadas as análises.

3 Resultados e Discussão

Nesta secção, primeiramente, são discutidos os critérios para a seleção do eléctrodo do trabalho através dos resultados obtidos. De seguida, está presente o processo de seleção e otimização da célula eletroquímica, isto é, o material que foi usado para miniaturizar a célula eletroquímica para a leitura de amostras, tornando-a o mais portátil possível. Depois, é referida a determinação de concentrações crescentes de TMP utilizando sistema de 3 eléctrodos dispostos individualmente, para a obtenção de uma curva de calibração, usando apenas TMP. É ainda referido que é realizada uma nova abordagem com dois eléctrodos dispostos individualmente. Logo de seguida, estão evidentes todos os resultados necessários para a otimização de diferentes parâmetros, de modo a desenvolver um biossensor capaz de determinar a presença de TMP em amostras reais. Esses parâmetros são: o volume de anticorpo, a concentração de anticorpo e o tempo de incubação do anticorpo. A seguir, são apresentadas as características analíticas do imunossensor com presença de anticorpo, isto é, determinação de uma zona de linearidade e obtenção do limite de deteção e de quantificação. Por fim, é feito um estudo da recuperação e avaliação do efeito matriz de modo a avaliar o funcionamento do biossensor desenvolvido, usando amostras alimentares de bacalhau.

3.1 Seleção do eléctrodo de trabalho

Vários tipos de eléctrodos amplamente usados em eletroquímica foram testados e comparados na obtenção de sinal eletroquímico da oxidação do TMP através do uso da técnica SWV. Deste modo, foram utilizados os seguintes eléctrodos de trabalho: 1. PyrGE; 2. GCE; 3. PGE; 4. BDDE; e 5. Eléctrodo CP. Numa fase adicional, foi adicionado papel de alumínio numa das extremidades do eléctrodo de CP para o mesmo não partir quando colocado nos crocodilos. Como eléctrodo auxiliar foi usado uma mina de grafite com 1 mm de diâmetro, e como eléctrodo de referência foi usada uma agulha de uma seringa de aço inoxidável com 0,9 mm de diâmetro.

Os resultados da comparação dos diferentes eléctrodos relativamente ao sinal de eletrooxidação do TMP estão presentes nas Figura 3.1 e Figura 3.2. Na Figura 3.1 estão voltamogramas obtidos por SWV de uma análise de TMP enquanto a comparação da densidade de corrente do pico entre os diferentes eléctrodos ($n=3$) está presente na Figura 3.2. Todos os voltamogramas das análises em triplicado de todos os eléctrodos estão presentes no Anexo A e os dados usados para a construção do gráfico de comparação da altura estão na Anexo B.

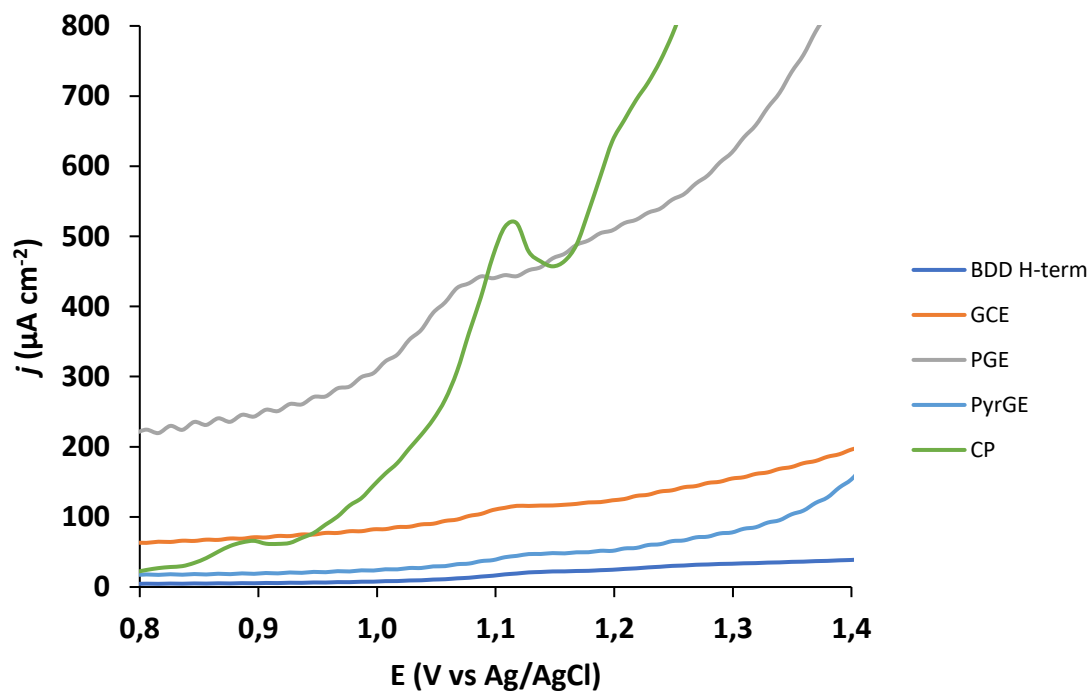


Figura 3.1 – Análise por voltametria de onda quadrada de 10 μM TMP em 0,1 M PBS pH 7,0 para os diferentes eletrodos (CP = papel fibra de carbono; GCE = eletrodo de carbono vítreo; PyrGE = eletrodo de grafite pirolítica; PGE = eletrodo de mina de grafite; BDD H-term = eletrodo de diamante dopado com boro com terminações H). Condições: frequência 20 Hz; degrau de potencial 0,01 V.

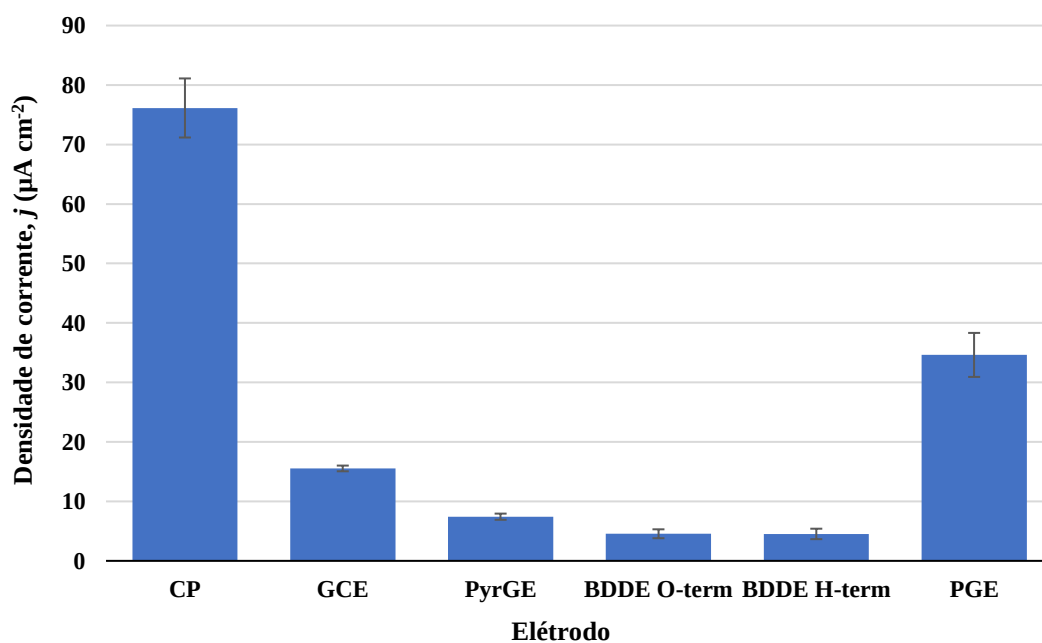


Figura 3.2 – Comparação da densidade de corrente do pico do trimetoprim para os diferentes eletrodos avaliados ($n=3$).

Entre todos os resultados obtidos, e de acordo com a Figura 3.1, verifica-se que a electrooxidação do TMP (10 μM) gera um pico voltamétrico mais ou menos extenso em todos os eléctrodos a um potencial de cerca de +1.1 V, sendo que o pico é visivelmente mais intenso com o eléctrodo CP. A altura do pico para o CP é significativamente maior em relação aos restantes eléctrodos tal como visível na Figura 3.2. Embora a área ativa do eléctrodo CP (0,070 cm^2) tenha sido essencialmente a mesma que as dos eléctrodos de GCE, BDDE e PyrGE (0,071 cm^2), a corrente destas foi normalizada em função das respetivas áreas. A área do eléctrodo PGE (0,031 cm^2) é inferior à do eléctrodo CP, cuja corrente foi também normalizada em função da área. Em contrapartida o eléctrodo CP apresentou também um maior desvio nos resultados em comparação com os restantes eléctrodos, tal como visível na Figura 3.2. Contudo o eléctrodo CP foi selecionado como eléctrodo de trabalho para o fabrico do imunossensor não só devido ao maior sinal eletroquímico gerado, mas também devido ao seu tamanho reduzido e ajustável para as dimensões pretendidas. Para além disto o eléctrodo de CP demonstra ser uma opção promissora pois trata-se de um eléctrodo feito de carbono, o qual é um material relativamente barato e abundante, permitindo o desenvolvimento de um biossensor mais acessível e monetariamente competitivo no mercado. Adicionalmente, como o eléctrodo de CP é constituído somente por carbono, este pode ser usado como adubo/fertilizante no seu fim de vida, contribuindo para uma economia circular, algo que sensores comuns de quartzo, por exemplo, não são capazes de contribuir.

3.2 Construção e otimização do sistema eletroquímico

A miniaturização do sistema eletroquímico é importante no desenvolvimento de imunossensores, uma vez que se pretende analisar pequenos volumes de amostra. Assim, foi testada uma célula eletroquímica de dimensões reduzidas (comparativamente com as células eletroquímicas tradicionais) para adição de menor volume de eletrólito, a qual foi construída a partir de material reciclável. Para o efeito utilizaram-se tubos Falcon® de plástico como descrito na Secção 2.2.2 (Figura 3.3), sendo usado um volume de 5 mL de eletrólito (tampão PBS).



Figura 3.3 - Miniaturização da célula eletroquímica através de um tubo Falcon®.

3.2.1 Análise de TMP utilizando sistema de 3 eletrodos dispostos individualmente

Foi efetuada a avaliação do sistema eletroquímico anteriormente descrito (Secção 3.2). Este teste foi realizado sem biomodificação da superfície do eletrodo de trabalho, ou seja, sem adição de anticorpo anti-TMP policlonal, para observar o comportamento do analito alvo na ausência do biorreceptor. Como eletrodos auxiliar e referência foram usados inicialmente uma mina de grafite (0,7 mm diâmetro, Rotring) e uma agulha de aço inoxidável, respetivamente, para efeitos de simplificação e miniaturização do sistema. Este sistema foi testado na determinação direta de TMP com concentrações crescentes (0,2 μM a 1,0 μM) usando o eletrodo de trabalho CP. Os resultados foram obtidos utilizando a técnica SWV e, na Figura 3.4, encontram-se representados os voltamogramas obtidos para as adições consecutivas de TMP e os dados obtidos para a intensidade de corrente em função da concentração.

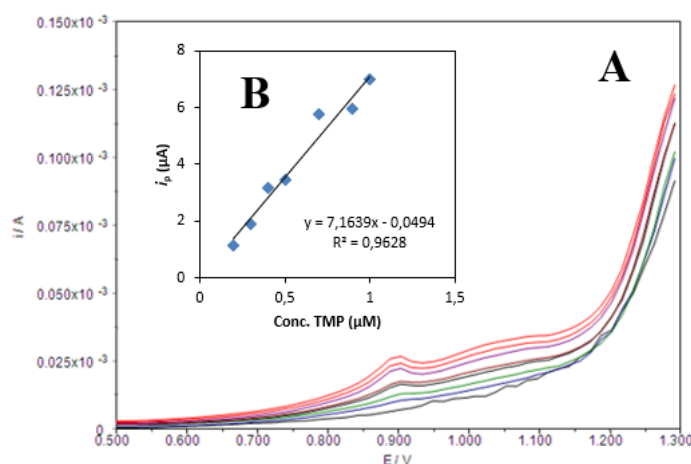


Figura 3.4 – (A) Voltamograma obtido e (B) curva de calibração do trimetoprim para um intervalo de concentrações entre 0,2 e 1 μM . Leitura eletroquímica feita entre + 0,5 V a + 1,3 V e a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s.

A altura do pico (i_p) foi obtida através do auxílio da opção “*peak search*” no programa GPES. Através da mesma, foi obtida a seguinte curva de calibração (equação 3.1, $n=7$):

$$i_p = 7,16 \times C - 0,0494 \quad (3.1)$$

Utilizando os dados da equação da reta de calibração é possível obter a concentração de uma determinada solução desconhecida através apenas da altura do pico.

3.2.2 Análise de TMP utilizando sistema de 2 eletrodos dispostos individualmente

Apesar de os resultados obtidos na Secção 3.2.1 demonstrarem ser promissores, esta abordagem não foi continuada devido a problemas posteriores de reprodutibilidade dos resultados, provavelmente atribuídos ao eletrodo de referência e /ou ao eletrodo auxiliar. Por este motivo, adotou-se um sistema diferente e mais simples, composto unicamente por dois eletrodos, através da junção do eletrodo de referência ao eletrodo auxiliar. O eletrodo de trabalho manteve-se o mesmo, ou seja, utilizou-se o eletrodo CP, e como de referência e auxiliar foi usado um GCE.

3.3 Otimização do imunoensaio

A otimização do imunoensaio foi realizada de acordo com as seguintes etapas: adição de uma alíquota de anticorpo anti-TMP na superfície do eléctrodo de trabalho, seguindo-se incubação durante um determinado tempo. Assim, a otimização dos diferentes parâmetros constitui uma parte fundamental desta tese. Procedeu-se inicialmente à leitura das concentrações crescentes de TMP na ausência de anticorpo (Figura 3.5A), seguindo-se das otimizações de tempo de incubação (10, 20, 30 e 60 minutos). O mesmo foi feito variando a concentração de anticorpo: 100 µg/mL (Figura 3.5B), 250 µg/mL (Figura 3.5C), e 500 µg/mL (Figura 3.5D).

Para cada parâmetro otimizado, é efetuada a adição de 100 µL de TMP, resultando num incremento da concentração do fármaco em 0,2 µM, sendo efetuadas as medições para as seguintes concentrações: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 µM. Após cada adição efetua-se a medição eletroquímica. Utiliza-se o sistema de dois eléctrodos que consiste em: eléctrodo de trabalho CP, e GCE como referência acoplado a auxiliar. Adiciona-se 5 mL de PBS (eletrólito) à célula eletroquímica e procede-se à medição, efetuada por SWV. Foi ainda realizada uma leitura inicial onde apenas o tampão PBS estava presente, de modo a ativar o eléctrodo e aumentar a fiabilidade dos resultados.

Foi utilizado o sistema eletroquímico descrito na Secção 3.2.2. Utilizou-se um eléctrodo individual para cada parâmetro em estudo, não sendo efetuadas réplicas devido ao tempo reduzido/limitado para efetuar este trabalho. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 3.5.

3.3.1 Efeito da concentração vs. tempo de incubação de anticorpo

Para o estudo inicial do efeito da concentração de TMP foram adicionados volumes consecutivos do fármaco na célula eletroquímica, a qual continha 5 mL da solução do eletrólito. Foi avaliada a interação entre a presença/ausência de anticorpo com concentrações crescentes de TMP (entre 0,2 e 1,4 µM).

Deste modo, para avaliar o efeito da concentração e do tempo de incubação do anticorpo, 10 µL de anti-TMP foram adicionados na superfície dos eléctrodos CP, com concentrações crescentes (0, 100, 250 e 500 µg/mL). Estes parâmetros foram avaliados inicialmente na ausência de anticorpo (Figura 3.5A) e em diferentes tempos de incubação: 0, 10, 20, 30, e 60 minutos.

Verifica-se que na ausência de anticorpo (branco, 0 µg/mL), ou seja, incubando tampão PBS em tempos distintos, o sinal obtido é sempre semelhante. Estes resultados demonstram que na ausência de anticorpo o tempo de incubação não tem interferência na construção do ensaio, sendo o sinal obtido semelhante mediante a exposição do eléctrodo de trabalho ao eletrólito (Figura 3.5A). Os resultados são importantes para efetuar a comparação entre a ausência e a presença de anticorpo, permitindo assim verificar a relevância da adição desta biomolécula. Deste modo, observa-se que quando se adiciona anticorpo à superfície do eléctrodo e se expõe em contacto com TMP há a variação/aumento do sinal eletroquímico de acordo com a concentração do anticorpo e o tempo de incubação. Estes resultados demonstram a importância da presença de anticorpo para a deteção do fármaco em estudo (Figura 3.5B, C e D).

Utilizando a concentração de anticorpo de 100 µg/mL (Figura 3.5B) são obtidos sinais com correntes entre 60 e 80 nA/cm² sendo os valores mais elevados obtidos para o tempo de incubação de 20

minutos (linha cinza), concluindo assim que este tempo demonstra ser o tempo ótimo. Para 30 minutos de incubação (linha azul) os resultados são igualmente razoáveis. Porém, para incubação de 10 minutos (linha amarela) e 60 minutos (linha laranja) os sinais são menores e semelhantes entre si. Ou seja, 10 minutos demonstram ser tempo insuficiente de incubação do anticorpo na superfície do elétrodo não permitindo a imobilização efetiva da biomolécula. Para um tempo elevado de incubação (60 minutos) ocorre a imobilização de maior quantidade de anticorpo, podendo decorrer uma orientação diferenciada na disposição destes à superfície do elétrodo levando à saturação do sinal e consequente diminuição do mesmo, gerando uma resposta inferior.

Relativamente à concentração de anticorpo de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3.5C) é possível concluir que o tempo de incubação de 10 minutos demonstrou um maior sinal, sendo assim o tempo de incubação ótimo para esta concentração. Ao contrário do que acontece para a concentração de anticorpo mais baixa em estudo (100 $\mu\text{g/mL}$) cujo tempo favorável era de 20 minutos, o mesmo não acontece para esta concentração intermédia de anti-TMP policlonal, isto porque como a concentração de anticorpos é maior, estes conseguem dispor-se na superfície do elétrodo num período consideravelmente menor. Os tempos de incubação de 30 e 60 minutos demonstram ser ineficazes na obtenção de sinal, isto porque é um tempo demasiado elevado, provocando reações inespecíficas entre as biomoléculas, levando a que a sua conformação fique desposta de forma menos orientada.

Por fim, para a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3.5D), apenas foi possível obter resultados para os tempos de 10 e 20 minutos. Verifica-se que para uma concentração tão elevada de anticorpo, o sinal de TMP não é detetado, uma vez que a gama de concentrações usadas não foi suficiente para ocupar todos os lugares ativos dos anticorpos presentes na superfície do elétrodo, não sendo efetuada a deteção. Estes resultados podem ser corroborados pelos tempos de incubação estudados: para tempos menores (10 minutos) existe provavelmente uma menor disposição de anticorpos na superfície, pelo que o lugar de locais ativos presentes é menor; para tempos superiores, ocorre uma disposição de anticorpos aumentada e, por consequência, não foi detetada a presença de TMP.

Deste modo, tendo em consideração os resultados obtidos, a sustentabilidade da metodologia e o tempo de análise, a concentração e tempo de incubação dos anticorpos consideradas ótimas para prosseguir os estudos foram 100 $\mu\text{g/mL}$ de anti-TMP com incubação de 20 minutos (Figura 3.5B).

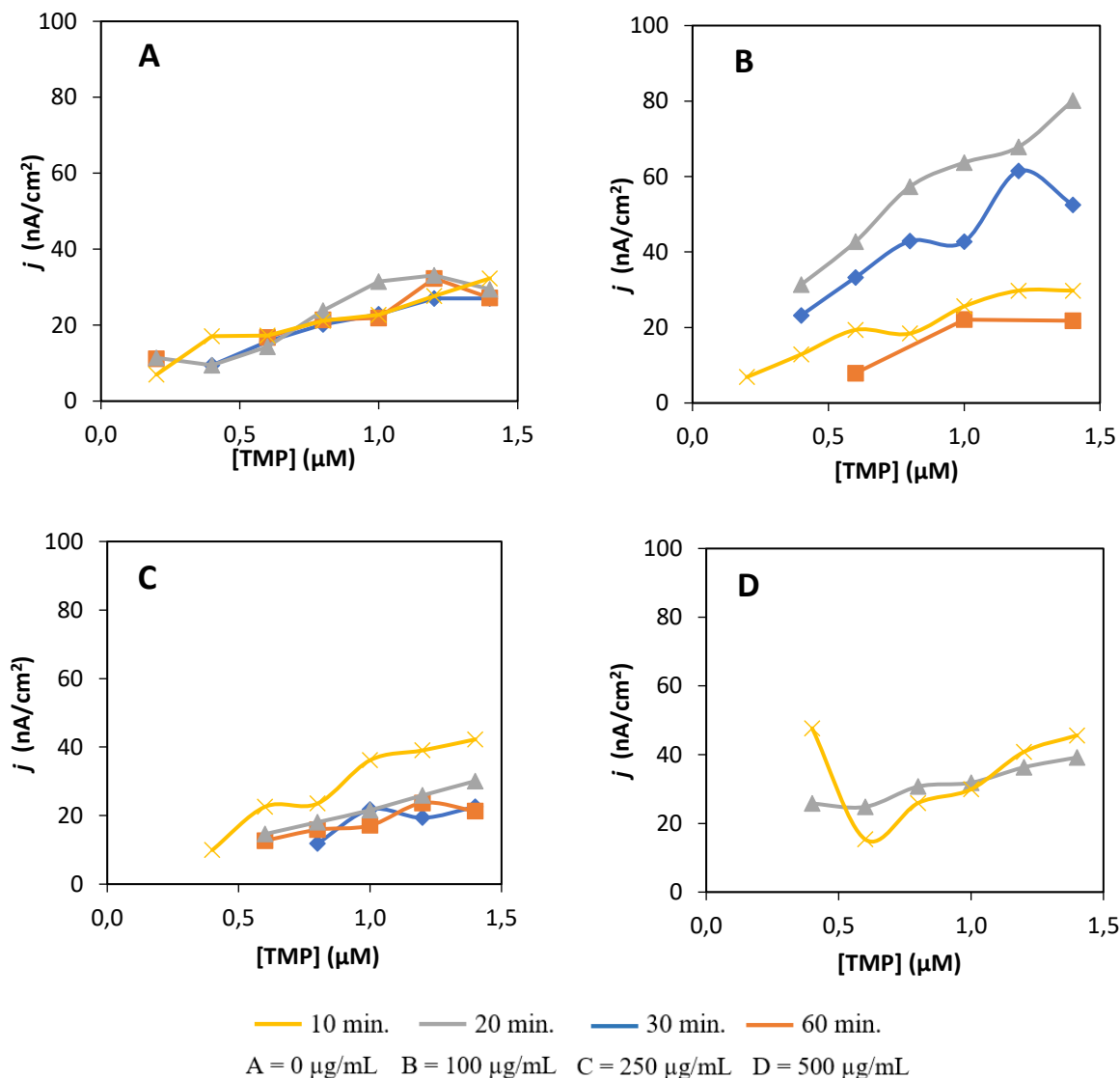


Figura 3.5 - Efeito da concentração e do tempo de incubação do anticorpo anti-TMP policlonal na superfície do eletrodo (A = 0 $\mu\text{g/mL}$; B = 100 $\mu\text{g/mL}$; C = 250 $\mu\text{g/mL}$; D = 500 $\mu\text{g/mL}$) (Amarelo = 10 minutos; Cinza = 20 minutos; Azul = 30 minutos; Laranja = 60 minutos).

3.3.2 Efeito do volume de anticorpo na incubação

Para além dos parâmetros previamente otimizados, é importante avaliar o volume da alíquota de anticorpo adicionado na superfície do eletrodo de trabalho para que a vasta maioria da área de trabalho do eletrodo seja preenchida, o qual foi testado aplicando alíquotas de diferentes volumes: 5, 10, 15 e 20 μL (concentração anticorpo anti-TMP de 100 $\mu\text{g/mL}$), procedendo-se à incubação durante 20 minutos (concentração e tempo previamente otimizados). Foi avaliada a interação entre o anticorpo em concentrações de TMP entre 0,2 e 1,4 μM . Os resultados obtidos estão presentes na Figura 3.6.

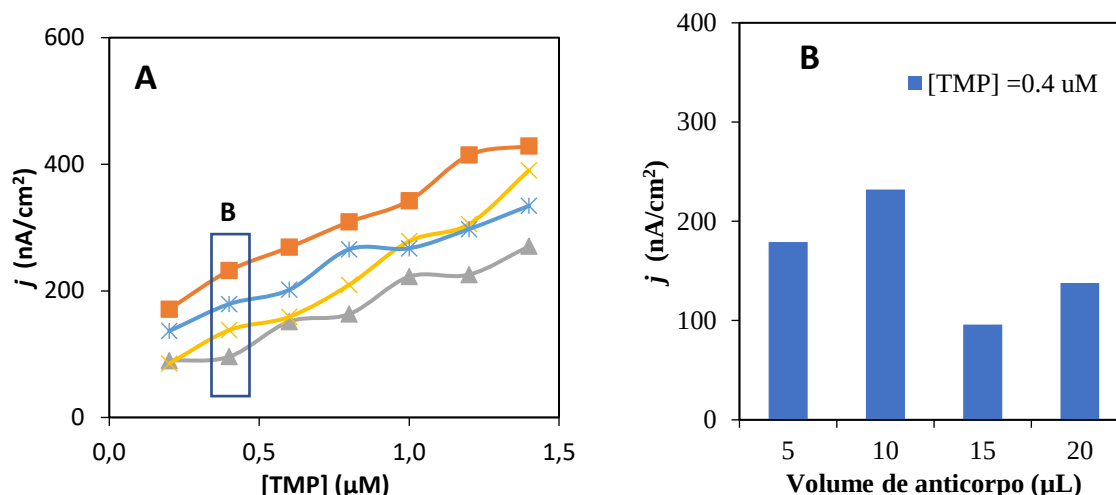


Figura 3.6 – (A) Efeito do volume de anticorpo na superfície do eléctrodo para uma concentração de 100 μg/mL e 20 minutos de incubação (Azul = 5 μL; Laranja = 10 μL; Cinza = 15 μL; Amarelo = 20 μL); (B) Sinal analítico (corrente por área de contacto) obtido pelos diferentes volumes de anticorpo usado, para uma concentração de trimetoprim de 0,4 μM.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que para o volume de 10 μL se obtém o melhor sinal analítico. Para os volumes de 15 e 20 μL o sinal é mais baixo comparativamente aos volumes de 5 e 10 μL (Figura 3.6A). O efeito observado pode ser justificado pelo facto de que a imobilização de anti-TMP policlonal em volumes mais elevados tendem para a imobilização menos orientada na superfície do eléctrodo CP, ou seja forma desordenada, resultando num menor sinal. Este facto decorre de forma similar ao descrito anteriormente, justificando-se pela orientação e interações não-específicas da biomolécula. Deste modo, os volumes menores (5 e 10 μL) demonstram ser mais eficazes na obtenção de um sinal analítico superior, uma vez que a imobilização decorre de forma controlada numa área delimitada do eléctrodo de trabalho. Mais especificamente, o volume de 10 μL demonstra ser, para toda a gama de concentração de TMP analisada, o que permite obter a melhor resposta analítica, permitindo concluir ser o volume de anticorpo ótimo. Quando se utiliza 5 μL, a quantidade de anticorpo e, consequentemente, de locais ativos é inferior, pelo que irá saturar mais rápido (Figura 3.6B). Verifica-se ainda que na avaliação efetuada para o volume de 20 μL, o sinal analítico tende a melhorar para valores mais elevados de TMP, sendo que para concentrações superiores a 1 μM se observa uma proximidade da intensidade obtida comparativamente com os volumes menores.

Assim, conclui-se que, tendencialmente, menores volumes de anticorpo imobilizado permitem a análise mais eficiente de concentrações mais baixas de fármaco e volumes maiores tendem a ser preferíveis para a análise de concentrações mais elevadas. Contudo, uma vez que o objetivo deste trabalho é a análise de concentrações baixas e/ou vestigiais, os volumes menores de anticorpo a imobilizar são preferíveis.

3.4 Características analíticas do imunossensor

Previamente à avaliação das características analíticas e com o intuito de melhorar o sinal analítico, foi efetuado um pré-tratamento de limpeza ao GCE (em H_2SO_4 0,5 M), o qual funciona como referência acoplado ao auxiliar.

Para avaliar o desempenho do imunossensor desenvolvido foram efetuadas adições sucessivas de TMP, variando a sua concentração entre 0,2 e 3,0 μM . Foram utilizados os parâmetros previamente otimizados para as biomoléculas (concentração de anticorpo de 100 $\mu\text{g/mL}$, volume de 10 μL , tempo de incubação de 20 minutos), e efetuadas adições contínuas de TMP pelo método de adição padrão, com o objetivo de observar a gama de linearidade. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 3.7.

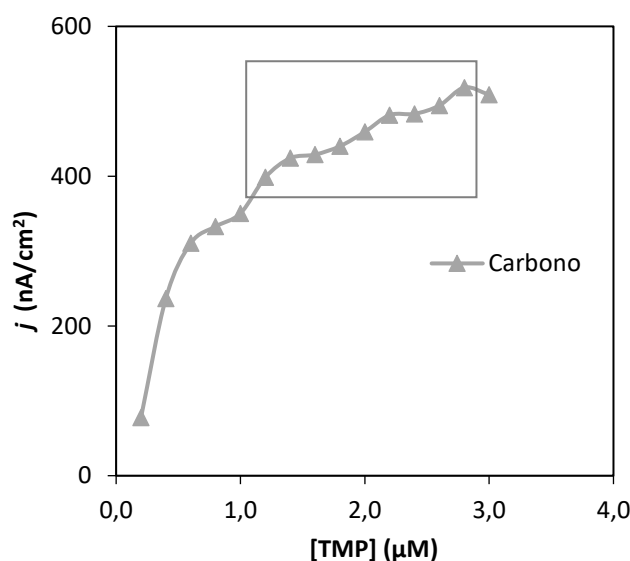


Figura 3.7 – Densidade de corrente do biossensor em função da concentração de trimetoprim entre 0,2 e 3,0 μM e usando os parâmetros ótimos de anticorpo (Cinza = eletrodo de carbono).

Observa-se que as densidades de corrente são consideravelmente elevadas, variando entre 77,76 e 518,4 nA/cm^2 , tendendo para um patamar a partir da concentração de 2,8 μM de TMP. Assim, a linearidade é obtida entre 1,2 e 2,8 μM de TMP, sendo estabelecida a reta de calibração para estes valores (j (nA/cm^2) = 70,13 [TPM] + 318,4; $R^2 = 0,979$; $n = 9$) (equação 3.2). A reta de calibração e a respetiva equação encontram-se apresentadas na Figura 3.8.

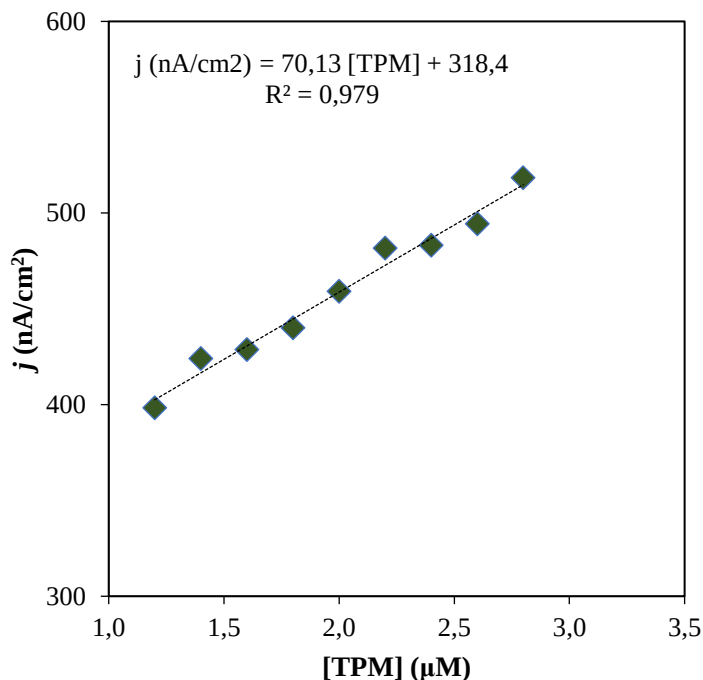


Figura 3.8 - Reta de calibração obtida com o biossensor entre 1,2 e 2,8 μM de trimetoprim (n=9). Dados obtidos por voltametria de onda quadrada, de 0,3 V a 1,5 V, velocidade de varrimento de 0,375 V/s, frequência de 25 Hz e degrau de potencial de 0,015 V.

De acordo com os dados obtidos, foi determinado o limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) utilizando as seguintes fórmulas: $LOD = 3 * S_{X0}/m$, e $LOQ = 10 * S_{X0}/m$, respetivamente, onde S_{X0} corresponde ao desvio padrão do método e ‘ m ’ ao declive, obtendo-se um LOD de 0,25 μM e LOQ de 0,84 μM. O LOD refere-se à concentração mínima que este sensor consegue detetar a presença de TMP, enquanto o LOQ refere-se à concentração mínima determinável com um nível de confiança de 95 % e para a qual existe repetibilidade (Miller & Miller, 2010). Relativamente à precisão do método, a mesma não foi avaliada pela insuficiência de tempo para executar este parâmetro. Foi dada relevância a todo o processo de otimização e construção do imunossensor de modo a obter um sistema inovador, diferenciável, e que permitisse efetuar a medição de sinais com menor volume de analito e de eletrólito.

Os valores do declive da equação da reta obtida para o imunossensor otimizado ($m = 70,1$, equação 3.2) foram comparados com a equação apresentada na Secção 3.3.1 onde foi analisado TMP, contudo sem a presença de anti-TMP policlonal imobilizado no elétrodo de trabalho ($m = 21,2$). Estes valores permitem comprovar a obtenção de melhor sensibilidade na análise de TMP utilizando o elétrodo de trabalho biomodificado com anti-TMP policlonal, a qual é bastante superior (aproximadamente 3,5 vezes).

3.5 Estudo da recuperação e avaliação do efeito matriz

De modo a avaliar o funcionamento do imunossensor desenvolvido, foram efetuados testes aplicados a amostras alimentares, nomeadamente a bacalhau. A extração de TMP das amostras foi efetuada de acordo com o procedimento indicado na Secção 2.4. A amostra foi fortificada, com as seguintes concentrações de TMP: 1,0; 1,5; 2,0; e 3,0 μM , obtendo-se excelentes percentagens de recuperação: 88,0%, 113,0%, 98,0%, e 99,0 %, respetivamente ($j \text{ (nA/cm}^2\text{)} = 47,4 \text{ [TPM]} + 126,4$; $r = 0,976$; $n = 4$) (equação 3.3). Estes resultados estão sumariamente descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Recuperação obtida do analito para diferentes concentrações.

[TMP] adicionada (μM)	[TMP] obtida (μM)	Recuperação (%)
<u>Bacalhau</u> ($j \text{ (nA/cm}^2\text{)} = 47,4 \text{ [TPM]} + 126,4$; $R^2 = 0,976$; $n = 4$) (3.3)		
1,0	0,88	88,0
1,5	1,69	113,0
2,0	1,96	98,0
3,0	2,97	99,0

De acordo com os dados obtidos é possível verificar que o imunossensor desenvolvido permite detetar com elevada precisão as amostras fortificadas, sendo assim adequado para análise de amostras que possam estar contaminadas com este fármaco.

Apesar de poder ser interessante efetuar uma comparação com dados obtidos na literatura, tal não foi feito, pois até à data não se encontram descritos outros imunossensores eletroquímicos desenvolvidos para a análise de TMP. Posto isto, o presente trabalho demonstra ser inovador para este tipo de análise, podendo ser uma opção versátil e diferenciadora comparativamente com os métodos tradicionais atualmente utilizados. Não obstante, existe um sensor reportado por Torrinha *et al.* (2020) para análise de TMP, o qual é efetuado de forma direta usando também um eletrodo CP, na análise de águas naturais. Porém, no trabalho citado não se efetuou qualquer análise em amostras alimentares, não sendo possível realizar uma comparação direta com este presente biossensor. Este estudo em questão está referenciado na Tabela 1.3.

4 Conclusões e perspectivas futuras

Os compostos farmacêuticos têm surgido para dar resposta ao contínuo aumento de doenças. A sua toma tem permitido a melhoria da qualidade de vida da população em geral, porém surge também uma problemática associada ao elevado consumo. Uma parte destes compostos consumidos não é digerido pelo organismo humano, existindo uma grande libertação dos metabolitos para o meio ambiente através, sobretudo, de urina e fezes, os quais têm prevalência em corpos aquáticos. Adicionalmente, o tratamento destes afluentes/efluentes é de extrema importância, porém grande parte das ETARs não possuem qualquer tipo de infraestrutura capaz de realizar a remoção ou um tratamento eficaz neste tipo de compostos. Os fármacos são assim considerados contaminantes emergentes devido ao aumento da sua frequência no meio ambiente e à falta de informação e legislação quanto à sua presença no mesmo. Por isso, existe uma preocupação crescente para a deteção e remoção eficaz destes poluentes e, deste modo, o objetivo deste trabalho passa pelo desenvolvimento de um biossensor capaz de detetar o TMP em amostras ambientais (como águas e/ou alimentos) utilizando um sistema inovador e com características vantajosas comparativamente aos usados tradicionalmente.

Os biossensores têm características diferenciadoras comparativamente com outros métodos analíticos convencionais, nomeadamente rapidez de análise, portabilidade, baixo custo, resposta rápida e facilidade de construção. Deste modo, o presente trabalho consistiu no desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a análise de TMP. Para o efeito, um eléctrodo CP serviu como transdutor e como base de imobilização do anticorpo anti-TMP policlonal, obtendo-se um imunossensor do tipo *label-free*. A escolha do eléctrodo CP foi feita não só devido à sua capacidade como transdutor, mas também tendo em mente a sua capacidade de reciclagem ou até introdução no solo como adubo, dado que é constituído por carbono, contribuindo assim para uma economia circular. O sistema eletroquímico foi miniaturizado e simplificado de forma a ser mais ambientalmente sustentável e potencialmente portátil. Para o efeito foi usada uma configuração de apenas 2 eléctrodos em que um GCE foi usado como eléctrodo auxiliar com a referência acoplada. A célula eletroquímica foi miniaturizada consistindo apenas na parte inferior de um tubo Falcon® de 50 mL, usando-se assim volumes de eletrólito PBS de 5 mL.

Foram efetuadas otimizações do imunossensor para diferentes parâmetros (volume, concentração e tempo de incubação do anticorpo anti-TMP policlonal). As otimizações demonstraram que uma alíquota de 10 μ L de anticorpo com concentração de 100 μ g/mL e tempo de incubação de 20 minutos eram as condições ótimas.

Através da técnica SWV, verificou-se que a resposta linear do imunossensor se encontrava entre 1,2 e 2,8 μ M, levando a um LOD de 0,25 μ M e LOQ de 0,84 μ M. O biorreceptor utilizado permitiu uma deteção do analito-alvo de forma orientada, com sensibilidade consideravelmente superior comparativamente com a análise efetuada com a ausência desta biomolécula.

Foram utilizadas amostras alimentares para a avaliação do imunossensor na deteção de TMP, nomeadamente em bacalhau. A extração foi efetuada de acordo com o procedimento indicado pelo fornecedor das biomoléculas e verificou-se que as recuperações se encontravam entre 88 % e 113 %.

Os resultados obtidos demonstram ser promissores, porém é necessário efetuar todo este trabalho com réplicas de modo a avaliar a precisão e exatidão do método, o qual não foi realizado devido ao reduzido tempo para a realização desta tese. Deste modo, como perspectivas futuras é sugerido que após a obtenção destes resultados seja efetuada uma validação por um método convencional tal como o ELISA.

Adicionalmente, o sistema eletroquímico pode ser melhorado, nomeadamente a célula, a qual pode ser obtida recorrendo a uma impressão 3D com medidas fixas e adequadas para o experimento. Esta nova célula teria características vantajosas, uma vez que é utilizado um volume consideravelmente inferior de eletrólito comparativamente às células tradicionalmente utilizadas. Adicionalmente, também seria interessante fazer análises em amostras de água, nomeadamente de efluentes de ETAR ou águas superficiais, as quais devem ser pré-tratadas, por exemplo, com extração de fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) ou microextração de fase sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Microextraction*).

5 Referências bibliográficas

- Abeykoon S., & White, R. (2023). Continuous Square Wave Voltammetry for High Information Content Interrogation of Conformation Switching Sensors. *ACS Measurement Science*. 3, 1-9. doi: 10.1021/acsmeasuresciau.2c00044
- Adrián, J., Fernández, F., Muriano, A., Obregon, R., Ramón-Azcon, J., Tort, N., & Marco, M.-P. (2009). Biosensors for Pharmaceuticals and Emerging Contaminants Based on Novel Micro and Nanotechnology Approaches. *Biosensors for Environmental Monitoring of Aquatic Systems*, 47–68. doi: 10.1007/978-3-540-36253-1_3
- Ahmad, R., Tripathy, N., Ahn, M.-S., Bhat, K. S., Mahmoudi, T., Wang, Y., ... Hahn, Y.-B. (2017). Highly Efficient Non-Enzymatic Glucose Sensor Based on CuO Modified Vertically-Grown ZnO Nanorods on Electrode. *Scientific Reports*, 7(1):5715. doi: 10.1038/s41598-017-06064-8
- Balkourani, G., Brouzgou, A., Archonti, M., Papandrianos, N., Song, S., & Tsiakaras, P. (2021). Emerging materials for the electrochemical detection of COVID-19. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 893, 115289. doi: 10.1016/j.jelechem.2021.115289
- Bontempelli, G., & Toniolo, R. (2009). MEASUREMENT METHODS | Electrochemical: Linear Sweep and Cyclic Voltammetry. *Encyclopedia of Electrochemical Power Sources*, 643–654. doi: 10.1016/b978-044452745-5.00069-1
- Bott, A. W. (n.d.). Practical Problems in Voltammetry: 4. Preparation of Working Electrodes. Bioanalytical Systems, Inc. Disponível em: cs16-3b.pdf (currentseparations.com)
- Cesarino, I., Cesarino, V., & Lanza, M. R. V. (2013). Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 188, 1293–1299. doi: 10.1016/j.snb.2013.08.047
- Chaniotakis, N., & Fouskaki, M. (2014). Bio-chem-FETs: field effect transistors for biological sensing. *Biological Identification*, 194–219. doi: 10.1533/9780857099167.2.194
- Chen, Y., Chen, F., Zhang, S., Cai, Y., Cao, S., Li, S., ... Wang, B. (2017). Facile Fabrication of Multifunctional Metal–Organic Framework Hollow Tubes To Trap Pollutants. *Journal of the American Chemical Society*, 139(46), 16482–16485. doi: 10.1021/jacs.7b10265
- Chen, Y., Liu, L., Song, S., Kuang, H., & Xu, C. (2016). Establishment of a monoclonal antibody-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of trimethoprim residues in milk, honey, and fish samples. *Food and Agricultural Immunology*, 27(6), 830–840. doi: 10.1080/09540105.2016.1183599
- Choudhary, Y. S., Jothi, L., & Nageswaran, G. (2017). Electrochemical Characterization. *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, 19–54. doi: 10.1016/b978-0-323-46140-5.00002-9
- Décima, M., Marzeddu, S., Barchiesi, M., Marcantonio, C., Chiavola, A. & Elona M. (2021). A Review on the Removal of Carbamazepine from Aqueous Solution by Using Activated Carbon and Biochar. *Sustainability*. 13(21). doi: 10.3390/su132111760
- Decisão 2020/1161 da comissão de 4 de agosto de 2020. Jornal Oficial da União Europeia. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020D1161>

- Deffo, G., Tene, T., Dongmo, L., Jiokeng, S., & Temgoua, R. (2023). Differential pulse and square-wave voltammetry as sensitive methods for electroanalysis applications. *Molecular Sciences and Chemical Engineering*. doi: 10.1016/B978-0-323-85669-0.00040-4
- Diretiva 2013/39/EU do Parlamento Europeu e do Conselho de 13 de agosto de 2013. *Jornal Oficial da União Europeia*. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:226:0001:0017:PT:PDF>
- Ebele, A. J., Abdallah, M. A., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3, pp 1-16. doi: 10.1016/j.emcon.2016.12.004
- Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2017). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361
- Elli, G., Hamed, S., Petrelli, M., Ibba, P., Ciocca, M., Lugli, P., & Petti, L. (2022). Field-Effect Transistor-Based Biosensors for Environmental and Agricultural Monitoring. *Sensors*, 22(11), p. 41-78. doi: 10.3390/s22114178
- Erdem, Ö., Derin, E., Sagdic, K., Yilmaz, E. G., & Inci, F. (2021). Smart materials-integrated sensor technologies for COVID-19 diagnosis. *Emergent Materials*, 4(1), 169–185. doi: 10.1007/s42247-020-00150-w
- Farré, M., Kantiani, L., & Barceló, D. (2012). Microfluidic Devices. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, 177–217. doi: 10.1016/b978-0-12-384862-8.00007-8
- Franklin, R. K., Martin, S. M., Strong, T. D., & Brown, R. B. (2016). Chemical and Biological Systems: Chemical Sensing Systems for Liquids. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. doi: 10.1016/b978-0-12-803581-8.00549-x
- Godoi, F. G. A., Muñoz-Peñuela, M., Olio Gomes, A. D., Tolussi, C. E., Brambila-Souza, G., Branco, G. S., ... Moreira, R. G. (2020). Endocrine disruptive action of diclofenac and caffeine on *Astyanax altiparanae* males (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 108720. doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108720
- González Peña, O. I., López Zavala, M. Á., & Cabral Ruelas, H. (2021). Pharmaceuticals Market, Consumption Trends and Disease Incidence Are Not Driving the Pharmaceutical Research on Water and Wastewater. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 2532. doi: 10.3390/ijerph18052532
- Greco, K. V., Bonesteel, J. K., Chanut, N., Wan, C. T., Chiang, Y., & Brushett, F. R. (2021). Limited Accessibility to Surface Area Generated by Thermal Pretreatment of Electrodes Reduces Its Impact On Redox Flow Battery Performance. *Energy Materials*. doi: 10.1021/acsaem.1c01980
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). *Electrochemical Biosensors – Sensor Principles and Architectures*. *Sensors*, 8, 1400-1458. ISSN 1424-8220.

- Hassan, M. H., Khan, R., & Andreescu, S. (2022). Advances in electrochemical detection methods for measuring contaminants of emerging concerns. *Electrochemical Science Advances*, vol. 2. doi: 10.1002/elsa.202100184
- Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D. R., & Hitzfeld, B. (2005). Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*, 75(1), 53–64. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.07.006
- Iria, A. (2018). Efeitos da presença de antibióticos nas origens de água. Contribuição para o estudo da sua remoção através de sistemas de tratamento de águas. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente, Perfil de Sanitária. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa. 110 pp.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, 1050–1074. doi: 10.3762/bjnano.9.98
- Jewell, K. S., Castronovo, S., Wick, A., Falås, P., Joss, A., & Ternes, T. A. (2016). New insights into the transformation of trimethoprim during biological wastewater treatment. *Water Research*, 88, 550–557. doi: 10.1016/j.watres.2015.10.026
- Justino, C. I. L., Gomes, A. R., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2017). Graphene based sensors and biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 91, 53–66. doi: 10.1016/j.trac.2017.04.003
- Kelly, R. S. (2020). *Analytical Electrochemistry: The Basic Concepts*. LibreTexts Chemistry. Disponível em: [Analytical Electrochemistry: The Basic Concepts - Chemistry LibreTexts](#)
- Kester, M., Karpa, K. D., & Vrana, K. E. (2012). Treatment of Infectious Diseases. Elsevier's Integrated Review Pharmacology, 41–78. doi: 10.1016/b978-0-323-07445-2.00004-5
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- Khare, S., Williams, K., & Gokulan, K. (2014). Nanotechnology. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 893–900. doi: 10.1016/b978-0-12-384730-0.00406-7
- Khare, T., Oak, U., Shriram, V., Verma, S. K., & Kumar, V. (2019). Biologically synthesized nanomaterials and their antimicrobial potentials. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 263–289. doi: 10.1016/bs.coac.2019.09.002
- Kim, T., Choi, W., Shin, H., Choi, J., Kim, J., Park, M., & Yoon, S. (2020). Applications of Voltammetry in Lithium Ion Battery Research. *Journal of Electrochemical Science and Technology*. 11(1), 14-25. doi: 10.33961/jecst.2019.00619
- Leal, A. (2020). Fármacos em Águas Residuais: Análise, Remoção e Biorecuperação. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade da Beira Interior. 90 pp
- Li, C., Zheng, B., Zhang, T., Zhao, J., Gu, Y., Yan, X., ... Zhang, Z. (2016). Petal-like graphene–Ag composites with highly exposed active edge sites were designed and constructed for electrochemical determination of metronidazole. *RSC Advances*, 6(51), 45202–45209. doi: 10.1039/c6ra01334a

- Li, M., Chen, J., Wu, W., Fang, Y., & Dong, S. (2020). Oxidase-like MOF-818 Nanozyme with High Specificity for Catalysis of Catechol Oxidation. *Journal of the American Chemical Society*. doi: 10.1021/jacs.0c07273
- Lindberg, R. H., Olofsson, U., Rendahl, P., Johansson, M. I., Tysklind, M., & Andersson, B. A. V. (2006). Behavior of Fluoroquinolones and Trimethoprim during Mechanical, Chemical, and Active Sludge Treatment of Sewage Water and Digestion of Sludge. *Environmental Science & Technology*, 40(3), 1042–1048. doi: 10.1021/es0516211
- Löffler, D., Römbke, J., Meller, M., & Ternes, T. A. (2005). Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environmental Science & Technology*, 39(14), 5209–5218. doi: 10.1021/es0484146
- Lu, K., Liu, J., Dai, X., Zhao, L., Yang, Y., Li, H., & Jiang, Y. (2021). Construction of a Au@MoS₂ composite nanosheet biosensor for the ultrasensitive detection of a neurotransmitter and understanding of its mechanism based on DFT calculations. *Royal Society of Chemistry*, 12, 798–809. doi: 10.1039/D1RA07962J
- Malerba, F., & Orsenigo, L. (2015). The evolution of the pharmaceutical industry. *Business History*, 57(5), 664–687. doi: 10.1080/00076791.2014.975119
- Malhotra, B. D., & Ali, M. A. (2018). Nanomaterials in Biosensors. *Nanomaterials for Biosensors*, 1–74. doi: 10.1016/b978-0-323-44923-6.00001-7
- Maruyama, T. (2021). Chapter 6 – Carbon nanotubes. *Handbook of Carbon-Based Nanomaterials*. pp. 299–319.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Prentice Hall, (6). ISBN: 978-0273730422
- Mimeault, C., Woodhouse, A. J., Miao, X.-S., Metcalfe, C. D., Moon, T. W., & Trudeau, V. L. (2005). The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, 73(1), 44–54. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.01.009
- Mitchell, J. (2010). Small Molecule Immunosensing Using Surface Plasmon Resonance. *Sensors*, 10(8), 7323–7346. doi: 10.3390/s100807323
- Moles, S., Mosteo, R., Gómez, J., Szpunar, J., Gozzo, S., Castillo, J. R., & Ormad, M. P. (2020). Towards the Removal of Antibiotics Detected in Wastewaters in the POCTEFA Territory: Occurrence and TiO₂ Photocatalytic Pilot-Scale Plant Performance. *Water*, 12(5), 1453. doi: 10.3390/w12051453
- Mollarasouli, Kurbanoglu, & Ozkan. (2019). The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis. *Biosensors*, 9(3), 86. doi: 10.3390/bios9030086
- Mpatani, F. M., Aryee, A. A., Kani, A. N., Han, R., Li, Z., Dovi, E., & Qu, L. (2021). A review of treatment techniques applied for selective removal of emerging pollutant-trimethoprim from aqueous systems. *Journal of Cleaner Production*, 308, 127359. doi: 10.1016/j.jclepro.2021.127359
- Nafisi, S., & Maibach, H. I. (2017). Nanotechnology in Cosmetics. *Cosmetic Science and Technology*, 337–369. doi: 10.1016/b978-0-12-802005-0.00022-7

- Nazari, E., & Suja, F. (2016). Effects of 17 β -estradiol (E2) on aqueous organisms and its treatment problem: a review. *Reviews on Environmental Health*, 31(4). doi: 10.1515/reveh-2016-0040
- ODS. (n.d.). 17 objetivos para um mundo mais sustentável e justo. Acedido a 21 de fevereiro de 2023 em: ods.pt.
- Okoth, O. K., Yan, K., Liu, L., & Zhang, J. (2015). Simultaneous Electrochemical Determination of Paracetamol and Diclofenac Based on Poly(diallyldimethylammonium chloride) Functionalized Graphene. *Electroanalysis*, 28(1), 76–82. doi: 10.1002/elan.201500360
- Petrucchi, R., Bortolami, M., Matteo, P. D., & Curulli, A. (2022). Gold Nanomaterials-Based Electrochemical Sensors and Biosensors for Phenolic Antioxidantes Detection: Recent Advances. *Nanomaterials*, 12, 959. doi: 10.3390/nano12060959
- Pingarrón, J. M., Labuda, J., Barek, J., Brett, C. M. A., Camões, M. F., Fojta, M., & Hibbert, D. B. (2020). Terminology of electrochemical methods of analysis (IUPAC Recommendations 2019). *Pure and Applied Chemistry*, 92(4), 641–694. doi: 10.1515/pac-2018-0109
- Prado, T. M. do, Cincotto, F. H., & Machado, S. A. S. (2017). Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and environmental samples. *Electrochimica Acta*, 233, 105–112. doi: 10.1016/j.electacta.2017.03.038
- Rezaei, B., & Irannejad, N. (2019). Electrochemical detection techniques in biosensor applications. *Electrochemical Biosensors*, 11–43. doi: 10.1016/b978-0-12-816491-4.00002-4
- Rosenfeld, P. E., & Feng, L. G. H. (2011). Emerging Contaminants. *Risks of Hazardous Wastes*, 215–222. doi: 10.1016/b978-1-4377-7842-7.00016-7
- Saleh, T. A., & Gupta, V. K. (2016). Synthesis, Classification, and Properties of Nanomaterials. *Nanomaterial and Polymer Membranes*, 83–133. doi: 10.1016/b978-0-12-804703-3.00004-8
- Scholar, E. (2007). Trimethoprim. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–6. doi: 10.1016/b978-008055232-3.62804-1
- Shaban, A., Telegdi, J., & Vastag, G. (2022). Chapter 5 – Self-assembling of nanobionics: from theory to applications. *Fundamentals of Bionanomaterials*. pp. 111-138.
- Simões, F. R., & Xavier, M. G. (2017). Electrochemical Sensors. *Nanoscience and Its Applications*, 155–178. doi: 10.1016/b978-0-323-49780-0.00006-5
- Singh, V., Yadav, P., & Mishra, V. (2020). Recent Advances on Classification, Properties, Synthesis, and Characterization of Nanomaterials. *Green Synthesis of Nanomaterials for Bioenergy Applications*, 83–97. doi: 10.1002/9781119576785.ch3
- Straub, J. (2013). An Environmental Risk Assessment for Human-Use Trimethoprim in European Surface Waters. *Antibiotics*, 2(1), 115–162. doi: 10.3390/antibiotics2010115
- Tajik, S., Dourandish, Z., Jahani, P. M., Sheikhshoaie, I., Beitollahi, H., Shahedi Asl, M., ... Shokouhimehr, M. (2021). Recent developments in voltammetric and amperometric sensors for cysteine detection. *RSC Advances*, 11(10), 5411–5425. doi: 10.1039/d0ra07614g

- Thakur, A., & Kumar, A. (2022). Recent advances on rapid detection and remediation of environmental pollutants utilizing nanomaterials-based (bio)sensors. *Science of Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155219.
- Torrinha, Á., Oliveira, T. M. B. F., Ribeiro, F. W. P., Correia, A. N., Lima-Neto, P., & Morais, S. (2020). Application of Nanostructured Carbon-Based Electrochemical (Bio)Sensors for Screening of Emerging Pharmaceutical Pollutants in Waters and Aquatic Species: A Review. *Nanomaterials*, 10(7), 1268. doi: 10.3390/nano10071268
- Venton, B., & DiScenza, D. (2020). Chapter 3 – Voltammetry. *Electrochemistry for Bioanalysis*. 27-50. doi: 10.1016/B978-0-12-821203-5.00004-X
- Villanueva, M. E., Puca, M., Perez Bravo, J., Bafico, J. G., Campo Dall’Orto, V., & Copello, G. J. (2020). Dual adsorbent-photocatalytic Keratin-TiO₂ photocatalytic nanocomposite for trimethoprim removal from wastewater. *New Journal of Chemistry*. doi: 10.1039/d0nj02784g
- Wang, C., & Yu, C. (2013). Detection of chemical pollutants in water using gold nanoparticles as sensors: a review. *Reviews in Analytical Chemistry*, 32(1), 1–14. doi: 10.1515/revac-2012-0023
- Wang, W.-X. (2016). Bioaccumulation and Biomonitoring. *Marine Ecotoxicology*, 99–119. doi: 10.1016/b978-0-12-803371-5.00004-7
- Wang, Z., Hu, T., Liang, R., & Wei, M. (2020). Application of Zero-Dimensional Nanomaterials in Biosensing. *Frontiers in Chemistry*, 8. doi: 10.3389/fchem.2020.00320
- Wei, S., Xiao, H., Cao, L., & Chen, Z. (2020). A Label-Free Immunosensor Based on Graphene Oxide/Fe₃O₄/Prussian Blue Nanocomposites for the Electrochemical Determination of HBsAg. *Biosensors*, 10(3), 24. doi: 10.3390/bios10030024
- Willner, M. R., & Vikesland, P. J. (2018). Nanomaterial enabled sensors for environmental contaminants. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). doi: 10.1186/s12951-018-0419-1
- Wong, A., Santos, A., Cincotto, F., Moraes, F., Filho, O., & Sotomayor, M. (2020). A new electrochemical platform based on low cost nanomaterials for sensitive detection of the amoxicillin antibiotic in diferente matrices.
- Wu, L., Lu, X., Fu, X., Wu, L., & Liu, H. (2017). Gold Nanoparticles dotted Reduction Graphene Oxide Nanocomposite Based Electrochemical Aptasensor for Selective, Rapid, Sensitive and Congener-Specific PCB77 Detection. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-05352-7
- Yu, G., Zhang, W., Zhao, Q., Wu, W., Wei, X., & Lu, Q. (2016). Enhancing the sensitivity of hexachlorobenzene electrochemical sensor based on nitrogen-doped graphene. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 235, 439–446. doi: 10.1016/j.snb.2016.05.072
- Yu, J., Wei, Z., Li, Q., Wan, F., Chao, Z., Zhang, X., Lin, L., Meng, H., Tian, L. (2021). Advanced Cancer Starvation Therapy by Simultaneous Deprivation of Lactate and Glucose Using a MOF Nanoplatfrom. *Adv. Sci.* 2021, 8, 2101467. doi: 10.1002/advs.202101467
- Yue, J., Yunlong, L., & Houzhi, C. (2022). High Quality TaS₂ Nanosheet SPR Biosensors Improved Sensitivity and the Experimental Demonstration for the Detection of Hg²⁺. *Nanomaterials*. doi: 10.3390/nano12122075.

Zulkifli, S. N., Rahim, H. A., & Lau, W.-J. (2018). Detection of contaminants in water supply: A review on state-of-the-art monitoring technologies and their applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 2657–2689. doi: 10.1016/j.snb.2017.09.078

Anexos

Anexo A. Resultados dos diferentes elétrodos usando SWV

Nesta divisão dos anexos estão presentes os gráficos potência (E , V) vs. corrente pela área de elétrodo usada (j , $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) obtidos com SWV. Foram realizadas medições para uma concentração de TMP de $10\text{ }\mu\text{M}$ através da adição de $100\text{ }\mu\text{L}$ de TMP em 10 mL de tampão.

A.1. Elétrodo de carbono vítreo

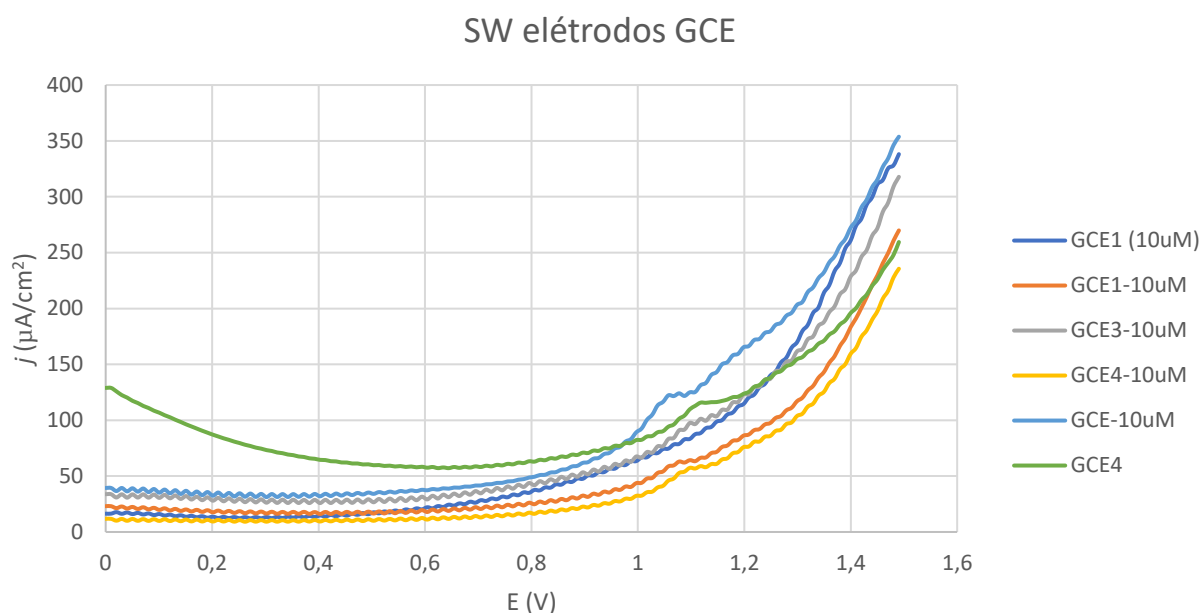


Figura A.1 – Voltametria de onda quadrada obtida com um elétrodo de carbono vítreo em solução com $10\text{ }\mu\text{M}$ de trimetoprim.

A.2. Eléttodos de papel de fibra de carbono

SW eléctodos de papel de fibra de carbono

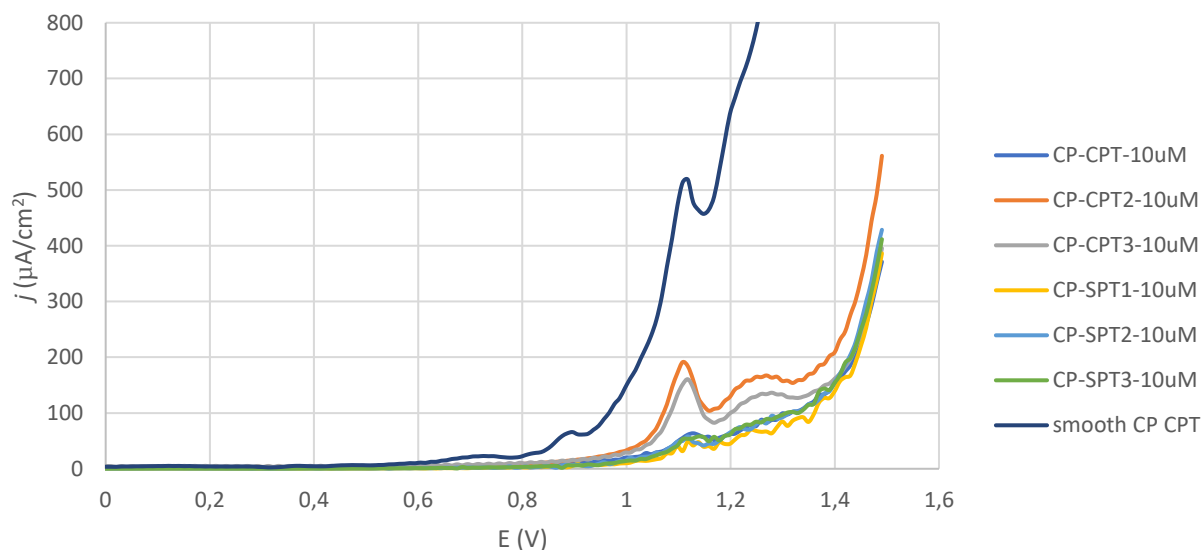


Figura A.2 - Voltametria de onda quadrada obtida com eléctodos de CP em solução com 10 μM de trimetoprim (CP = papel de fibra de carbono; CPT = Com pré-tratamento eletroquímico; SPT = Sem pré-tratamento eletroquímico).

A.3. Eléttodo de mina de grafite

SW eléctodos grafite

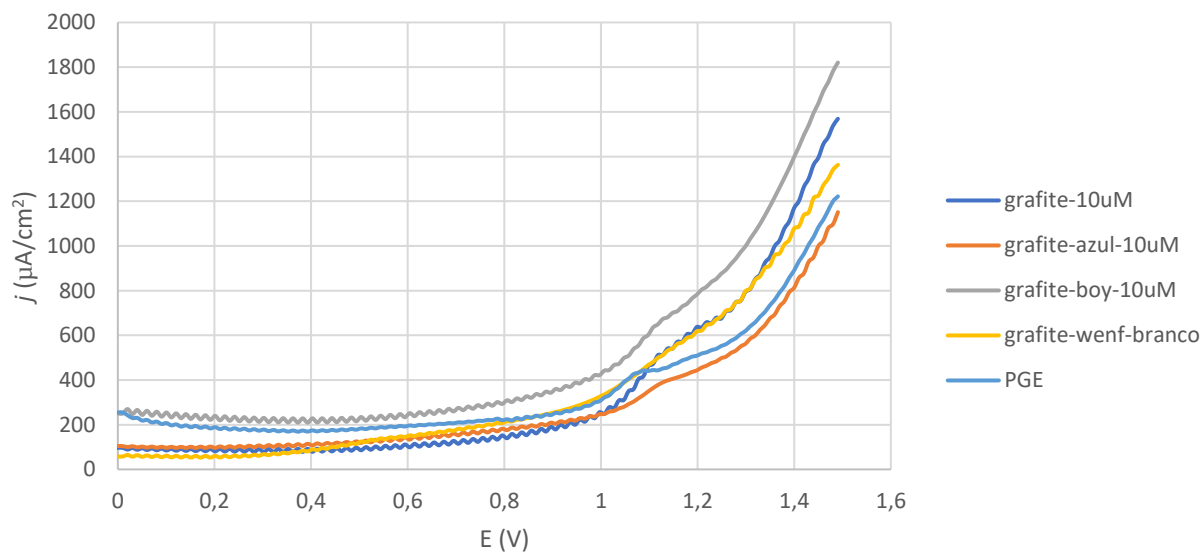


Figura A.3 - Voltametria de onda quadrada obtida com eléctodos de grafite em solução com 10 μM de trimetoprim.

A.4. Eléctrodo de grafite pirolítica

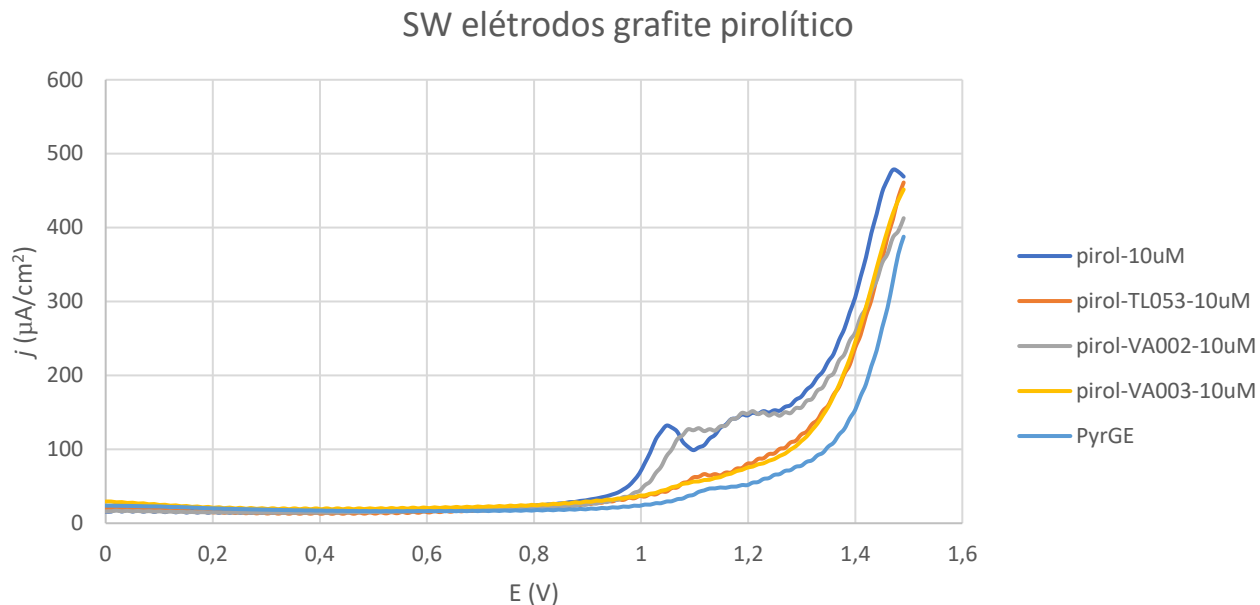


Figura A.4 - Voltametria de onda quadrada obtida com eléctrodos de grafite pirolítica em solução com 10 μM de trimetoprim.

A.5. Eléctrodo de diamante dopado com boro

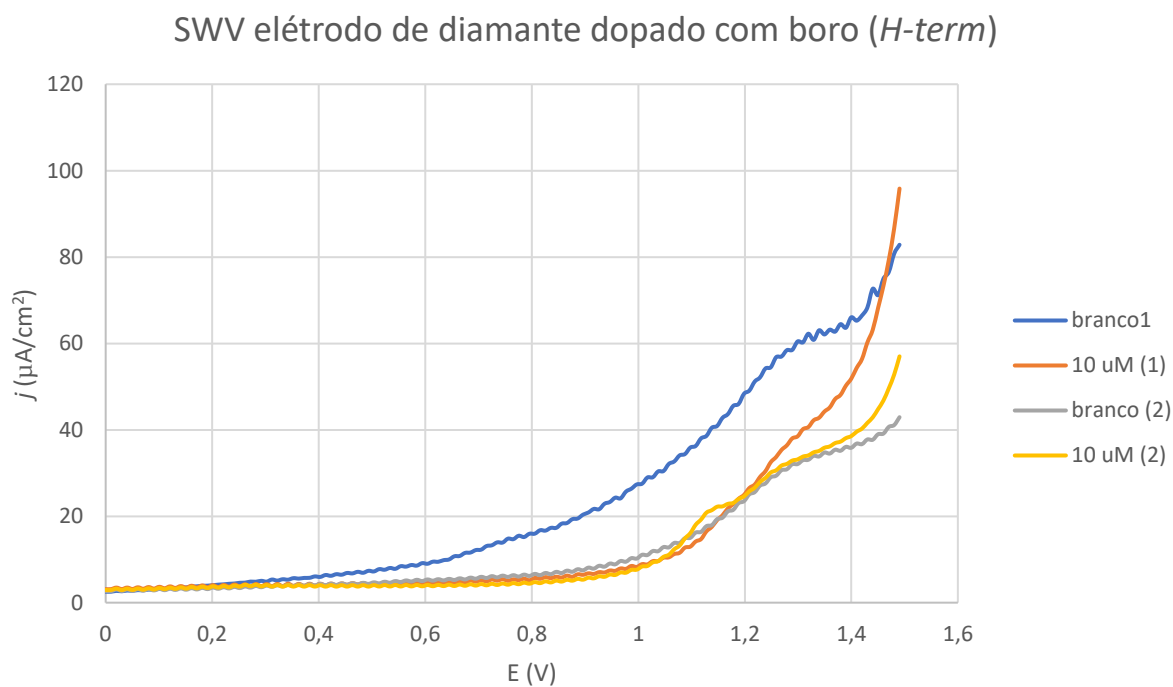


Figura A.5 - Voltametria de onda quadrada obtida com eléctrodos de diamante dopados com boro em solução com 10 μM de trimetoprim (*H-term*).

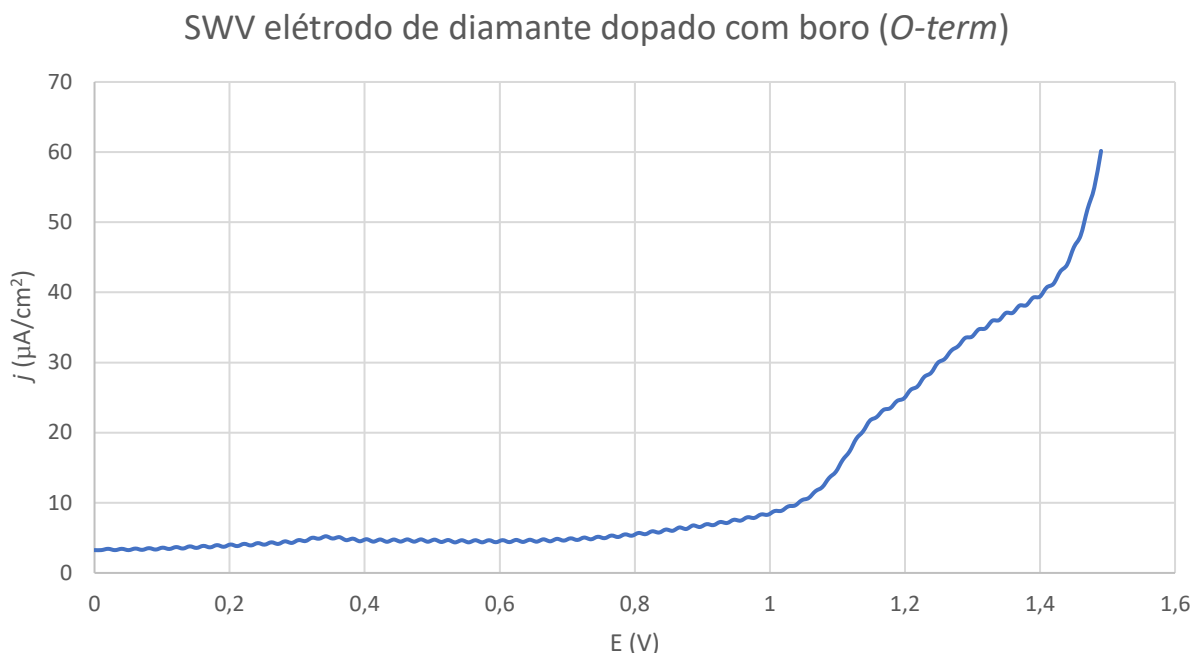


Figura A.6 - Voltametria de onda quadrada obtida com elétrodos de diamante dopados com boro em solução com 10 μM de trimetoprim (*O-term*).

Anexo B. Comparação da altura do pico do TMP para os diferentes elétrodos

A comparação das diferentes alturas dos picos para os diferentes elétrodos avaliados (CP, GCE, BDDE, PGE e PyrGE) foi feita através da média dos triplicados ($n=3$). A Tabela B.1 seguinte demonstra os dados usados para o efeito, bem como o desvio padrão.

Tabela B.1 - Dados usados para a comparação da altura dos picos do trimetoprim para os diferentes elétrodos avaliados.

	Elétrodo 1			Elétrodo 2			Elétrodo 3			Média	Desvio Padrão
	i (μA)	Área (cm^2)	j ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	i (μA)	Área (cm^2)	j ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	i (μA)	Área (cm^2)	j ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	j ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	j ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
CP	4,92	0,070	70,3	5,77	0,070	82,4	5,30	0,070	75,7	76,1	4,97
GCE	1,15	0,071	16,2	1,07	0,071	15,1	1,09	0,071	15,4	15,5	0,48
PyrGE	0,485	0,071	6,83	0,575	0,071	8,10	0,521	0,071	7,34	7,42	0,52
BDDE <i>O-term</i>	0,251	0,071	3,54	0,342	0,071	4,82	0,377	0,071	5,31	4,55	0,75
BDDE <i>H-term</i>	0,312	0,071	4,39	0,250	0,071	3,52	0,402	0,071	5,66	4,53	0,88
PGE	1,22	0,031	39,4	1,06	0,031	34,2	0,940	0,031	30,3	34,6	3,69