



**Ana Sofia Correia de
Sousa**

Sensores químicos para antibióticos em aquicultura

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para o cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Marta Isabel dos Santos Veríssimo Amaral, Investigadora Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes
Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro Gaspar,
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da
Universidade Nova de Lisboa

Agradecimentos

À minha orientadora, Doutora Maria Tereza Seabra dos Reis Gomes, por toda a disponibilidade, paciência, motivação, por todos os puxões de orelhas, por toda a alegria com as pequenas vitórias e por todos os conhecimentos que me transmitiu ao longo do todo o processo.

À minha coorientadora Doutora Marta Isabel dos Santos Veríssimo Amaral, por toda a boa disposição, simpatia, disponibilidade, paciência, ajuda, compreensão, motivação e por todo o conhecimento que me transmitiu.

A todas as minhas colegas de laboratório, Mariana Raposo, Sílvia Reis e Catarina Moreirinha, por toda a ajuda, boa disposição, simpatia e por toda a partilha de conhecimento e de ideias.

A todos os meus amigos que me apoiaram e me incentivaram, um muito obrigado.

E por último, um agradecimento muito especial a toda a minha família, aos meus pais, a minha avó, que sem eles isto não era possível.

Obrigada a todos por tornarem isto possível.

Palavras-chave

Antibióticos; Aquicultura; Oxitetraciclina; Sensores de Massa; Cristais piezoelétricos de quartzo; Polímeros molecularmente impressos;

Resumo

A oxitetraciclina é um dos antibióticos mais usados no tratamento de peixes de aquicultura na Europa. A presença de elevadas quantidades deste antibiótico em águas de aquicultura pode levar à contaminação dos recursos hídricos e ao aparecimento de resistência bacteriana. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sensor de massa para detetar a oxitetraciclina (OTC) nas águas da aquicultura, tendo por base os cristais de quartzo piezoelétricos (QCM) com polímeros molecularmente impressos (MIP) como elemento de reconhecimento. Sintetizaram-se quatro polímeros molecularmente impressos (MIP-1, MIP-2, MIP-3, MIP-4) descritos na literatura para a deteção da OTC. Para imobilizar os MIPs na superfície do cristal de quartzo, estes foram introduzidos numa membrana de PVC e plastificante, dissolvida em tetrahydrofurano (THF), que posteriormente foi colocada na superfície de ouro do eletrodo do cristal piezoelétrico. Os cristais depois de revestidos e secos foram avaliados num sistema de injeção em fluxo (FIA). A injeção de soluções padrão com diferentes concentrações da oxitetraciclina e dos seus possíveis interferentes, permitiu construir as várias curvas de calibração e estudar o comportamento do sensor. O objetivo era perceber qual o polímero molecularmente impresso que melhor se adequa para a deteção da OTC. Os sensores revestidos com o MIP-1 e o MIP-2 foram os que se mostraram ser mais seletivos para a OTC face à tetraciclina (TC), à ciprofloxacina (CIP), à enrofloxacina (ENR) e ao ácido oxolínico (AO). No entanto o MIP-2 respondeu mais ao NaCl do que o MIP-1, o que torna a sua aplicação desaconselhada em águas estuarinas. O sensor revestido com o MIP-1 apresenta uma sensibilidade para a OTC em tampão HEPES de $502275 \text{ Hz L mol}^{-1}$, um limite de quantificação (LOQ) de 4,91 ppm e um limite de deteção (LOD) de 1,47 ppm. Contudo estes valores podem ser otimizados no futuro, otimizando o revestimento do sensor, na quantidade, disposição de MIP e o modo como este se encontra incorporado do PCV.

Keywords

Antibiotics; Aquaculture; Oxytetracycline; Mass sensors; Piezoelectric quartz crystals; Molecularly imprinted polymers;

Abstract

Oxytetracycline is one of the most widely used antibiotics in the treatment of aquaculture fish in Europe. The presence of high amounts of this antibiotic in aquaculture waters can lead to contamination of water resources and the appearance of bacterial resistance. The main goal of this work was the development of a mass sensor to detect oxytetracycline (OTC) in aquaculture waters, based on piezoelectric quartz crystals (QCM) with a molecularly imprinted polymers (MIP) as a recognition element.

Four molecularly imprinted polymer (MIP) recipes existing in the literature, for OTC measurement were synthesized (MIP-1, MIP-2, MIP-3, MIP-4). These four MIP were immobilized on the surface of the quartz crystal, by introduced them into a plasticized PVC membrane dissolved in tetrahydrofuran (THF), which was later placed on the gold surface of the piezoelectric crystal electrode. The crystals, after being coated and dried, were evaluated in a flow injection system (FIA). The injection of standard solutions with different concentrations of oxytetracycline or possible interfering compounds, allowed to build the various calibration curves and study the behaviour of the sensor. The goal was to understand which molecularly imprinted polymer best suits for OTC detection.

The sensors coated with MIP-1 and MIP-2, were the ones that proved to be more selective for OTC compared to the possible interfering compounds, tetracycline (TC), ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR) and oxolinic acid (AO). However, MIP-2 responded more to NaCl than MIP-1, which discourages its application in estuarine waters. The sensor coating with MIP-1, has an OTC sensitivity in HEPES buffer of 502275 Hz L mol⁻¹, a quantification limit (LOQ) of 4,91 ppm and a detection limit (LOD) of 1,47 ppm. These values can be optimized in the future, optimizing the sensor coating, in quantity, disposition on the quartz crystal and the way it is incorporated in the PVC.

Índice Geral

Índice de figuras	vii
Lista de tabelas	x
Nomenclatura	xi
1 – Introdução	1
1.1 - Aquicultura.....	1
1.1.1 - Tipos e regimes da aquicultura	1
1.2 - Antibióticos	2
1.2.1 - Antibióticos permitidos	4
1.2.2 - Antibióticos no meio ambiente.....	4
1.3 - A Oxitetraciclina	6
1.3.1 - A oxitetraciclina em solução aquosa	7
1.3.2 - Formas de utilização da oxitetraciclina	8
1.3.3 – Degradação da oxitetraciclina.....	8
1.4 - Métodos de detecção de antibióticos em água.	9
1.5 - Sensores de massa	11
1.5.1 - Polímero molecularmente impresso (MIP) como elemento de reconhecimento	13
2 - Materiais e métodos	19
2.1 – Reagentes e químicos:	19
2.2 - Síntese de MIP	19
2.3 - Análise do MIP.....	21
2.4 – Camada de reconhecimento.....	21
2.5 - Arranjo experimental.....	22
2.6 - Preparação de soluções.....	23
3 - Resultados e Discussão	25
3.1 - Comparação dos polímeros molecularmente impressos para reconhecimento da OTC, descritos na literatura.....	25
3.1.1 - Composição e morfologia dos polímeros molecularmente impressos.....	25
3.1.2 - Análise do revestimento do cristal de quartzo e a sua influência na resposta do sensor	28
3.1.3 - Estudo da influência do pH.....	34
3.1.4 - Avaliação de possíveis interferentes.....	36
3.1.5 – Comportamento em água	36
3.1.6 – Comportamento em tampão HEPES.....	39
3.1.7 – Comportamento em água vs. comportamento em tampão HEPES	46
3.1.8 - Qual o melhor MIP?	47
4 - Conclusões gerais	51
Bibliografia	53
Anexo A- Tabelas	i
Anexo B- Espectros FTIR-ATR.....	vii
Anexo C- Gráficos	x

Índice de figuras

Figura 1 - Origem e possíveis rotas dos fármacos no ambiente -----	5
Figura 2 - Estrutura química da OTC; i- sistema tricarbonilo; ii- sistema de dicetona fenólica; iii- grupo dimetilamina -----	6
Figura 3 - Representação esquemática do estado de protonação da OTC. -----	7
Figura 4 - Representação gráfica do estado de protonação da OTC. -----	7
Figura 5 - Circuito elétrico equivalente, proposto por <i>Van Dyke</i> que modela um cristal piezoelétrico de quartzo. R1 representa a resistência, CI e C0 a capacidade e L1 a indutância. -----	12
Figura 6 - Representação esquemática de uma microbalança de cristais de quartzo -----	12
Figura 7 - Representação esquemática da síntese do polímero molecularmente impresso para OTC. -----	18
Figura 8 - Fotografia da montagem experimental para a síntese de MIP. 1- reator de parede dupla; 2- condensador; 3- banho; 4-placa de agitação; 5- suporte. -----	21
Figura 9 - Fotografia da montagem experimental para lavagem com Soxhlet; 1- manta de aquecimento; 2-balão com solvente extrator; 3- câmara de extração; 4- condensador. -----	21
Figura 10 - Representação esquemática do arranjo experimental para o sistema de FIA com detecção por microbalanças de cristais piezoelétricos de quartzo. -----	23
Figura 11 - Foto do arranjo experimental para o sistema de FIA com detecção por microbalanças de cristais piezoelétricos de quartzo. -----	23
Figura 12 – Espectro obtido por FTIR-ATR dos vários MIPs sintetizados. -----	26
Figura 13 - Espectro obtido por FTIR-ATR da OTC. -----	27
Figura 14 - Espectro obtido por FTIR-ATR do ácido metacrílico. -----	27
Figura 15 - Resultados das quatro sínteses de polímeros molecularmente impressos, após moagem e passagem por um peneiro de 200 μm . -----	28
Figura 16 - Leitura da f_{min} (frequência à impedância mínima), da f_{max} (frequência à impedância máxima), da f_s (frequência de ressonância em serie) e do f_p (frequência de ressonância em paralelo), aquando a deposição em cima do cristal uma membrana de PVC/NPOE sem MIP, MIP, seguindo-se uma nova camada de membrana de PVC/NPOE sem MIP. -----	29
Figura 17 - Leitura da R_1 (resistência) e da L_1 (indutância) aquando a deposição em cima do cristal uma membrana de PVC/NPOE sem MIP, MIP, seguindo-se uma nova camada de membrana de PVC/NPOE sem MIP. -----	29
Figura 18 - Fotos dos revestimentos A (ensaio 1 e 2), B (ensaio 1 e 2), C (ensaio 1 e 2). Os cristais apresentam o respetivo decréscimo na frequência em serie (Δf). -----	31

- Figura 19** - Representação gráfica das zonas de linearidade das curvas de calibração da OTC em água Milli-Q, com um caudal entre 0,8-0,9 mL/min, para os revestimentos A (ensaio 1 e 2), B (ensaio 1 e 2), C (ensaio 1 e 2). ----- 31
- Figura 20** - Fotos dos cristais revestidos com uma membrana de MIP em solução de PVC (30%) e NPOE (60%), em THF. Os cristais apresentam o respetivo decréscimo na frequência (Δf). ----- 33
- Figura 21** – Representação gráfica da zona linear das curvas de calibração da OTC em água Milli-Q, de 4 cristais, A e B revestidos com o MIP-1 e C e D revestidos com o MIP-2. Em cada gráfico indica-se o decréscimo de frequência devido ao revestimento. ----- 33
- Figura 22** - Representação gráfica das respostas do sensor a uma solução de OTC de concentração de 50,0 ppm em função do pH da mesma. ----- 34
- Figura 23** - Resposta típica de um cristal revestido com uma membrana com MIP-1 disperso na membrana de PVC (30%) e NPOE (60%) a uma injeção de uma solução de 50,0 ppm a um pH 2,63. ----- 35
- Figura 24** - Estrutura química da TC, CIP, ENR, AO, cloreto de sódio e do cloreto de magnésio. ----- 36
- Figura 25** - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC em mol/L, e em água Milli-Q, com um caudal de 0,77 mL/min para o MIP-1, MIP-2, MIP-3 e de 0,80 mL/min.MIP-4. ----- 37
- Figura 26** - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol/L, e em água Milli-Q, com um caudal de 0,76 mL/min. Cristal revestido com MIP-1. ----- 38
- Figura 27** - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol/L, e em tampão HEPES de 0,001M, com um caudal de 0,73 mL/min. Cristal revestido com MIP-1. ----- 40
- Figura 28** - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol/L, em tampão HEPES de 0,001M, com um caudal de 0,73 mL/min. Cristal revestido com MIP-2. ----- 41
- Figura 29** - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol/L, e em tampão HEPES 0,001M, com um caudal de 0,73 mL/min. Cristal revestido com MIP- 3. ----- 43
- Figura 30** - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol/L, e em tampão HEPES de 0,001M, com um caudal de 0,80 mL/min. Cristal revestido com MIP-4. ----- 45

Figura 31- Respostas obtidas para cristais revestidos com o MIP-1, MIP-2, MIP-3 e MIP-4, com a passagem de uma solução de OTC em água Mill-Q (A e B) e em tampão de HEPES (C e D), com um $\Delta F \approx 9$ Hz (A e C) e $\Delta F \approx 18$ Hz (B e D). ----- 46

Figura 32 - Representação gráfica das sensibilidades relativas em relação à OTC, desta e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol, para os vários MIPs sintetizados neste trabalho. ----- 49

Lista de tabelas

Tabela 1 - Principais classes de antibióticos existentes, a sua classificação e mecanismo de ação. - -----	3
Tabela 2 - Métodos de administração dos antibióticos na aquicultura e suas principais característica. -----	4
Tabela 3 - Concentrações da oxitetraciclina no ambiente, encontradas na Europa. -----	5
Tabela 4 - Algumas propriedades do hidrócloro de oxitetraciclina. -----	6
Tabela 5 - Estudos realizados para a detecção da OTC em água, nos últimos anos. -----	10
Tabela 6 - Sensores óticos desenvolvidos para determinar a OTC em água de aquicultura, nos últimos anos. -----	11
Tabela 7 - Principais métodos de polimerização em solução, as suas características e desvantagens. -----	17
Tabela 8 - Lista de receitas de síntese de MIPS para detetar a OTC. -----	17
Tabela 9 - Tabela resumo da síntese de MIP para a OTC, seguindo as diversas receitas descritas na literatura. -----	25
Tabela 10 - Sensibilidade, Δf e características dos revestimentos A (ensaio 1 e 2), B (ensaio 1 e 2) e C (ensaio 1 e 2). -----	32
Tabela 11 - Resposta do sensor a uma solução tampão HEPES de concentração 0,001M. -----	35
Tabela 12 - Sensibilidades, LOQ e LOD, para os cristais revestidos com o MIP-1, MIP-2, MIP-3 e MIP-4 em água Milli-Q. -----	37
Tabela 13 - Sensibilidades relativas, sensibilidades, LOQ e LOD, para a OTC, TC, CIP, ENR, AO, NaCl e MgCl ₂ , em água Milli-Q. Cristal revestido com MIP-1. -----	38
Tabela 14 - Sensibilidades relativas, sensibilidades, LOQ e LOD, para a OTC, TC, CIP, ENR, AO, NaCl e MgCl ₂ , em tampão HEPES. Cristal revestido com MIP-1. -----	40
Tabela 15 - Sensibilidades relativas, sensibilidades, LOQ e LOD, para a OTC, TC, CIP, ENR, AO, NaCl e MgCl ₂ , em tampão HEPES. Cristal revestido com MIP-2. -----	42
Tabela 16 - Sensibilidades relativas, sensibilidades, LOQ e LOD, para a OTC, TC, CIP, ENR, AO, NaCl e MgCl ₂ , em tampão HEPES. Cristal revestido com MIP-3. -----	43
Tabela 17 - Coeficientes de seletividade, sensibilidades, LOQ e LOD, para a OTC, TC, CIP, ENR, AO, NaCl e MgCl ₂ , em tampão HEPES. Cristal revestido com MIP-4. -----	45
Tabela 18 - Tabela síntese de algumas das propriedades dos MIPS utilizados neste trabalho. ---	48

Nomenclatura

OTC	Oxitetraciclina
TC	Tetraciclina
ENR	Enrofloxacina
CIP	Ciprofloxacina
AO	Ácido oxolínico
NaCl	Cloreto de sódio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MIP	Polímero molecularmente impresso
QCM	Microbalança de cristais de quartzo
MF	Monómero funcional
MM	Molécula molde
ALC	Agente de reticulação
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação

1 – Introdução

Esta secção do trabalho tem como foco contextualizar o problema, introduzir conceitos e técnicas que irão ser utilizadas ao longo deste trabalho.

1.1 - Aquicultura

Com o aumento da população global, prevendo-se que atinja os 9 biliões em 2050, surge a necessidade de assegurar alimento para todas as pessoas [1], [2]. Globalmente o peixe representa aproximadamente 16,6 % da oferta de proteína animal e 6,5% de toda a proteína para consumo humano. Desta forma, a aquicultura tem ganho grande importância pois satisfaz as necessidades e evita a pesca intensiva de algumas espécies [1], [2], estimando-se que até ao final de 2030 aproximadamente 2/3 dos alimentos de origem aquática sejam criados pelo Homem [3].

Segundo a Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos (DGRM), a aquicultura é definida como criação ou cultura de organismos aquáticos, desde peixes, algas, crustáceos, répteis, anfíbios e moluscos, pressupondo a intervenção humana no processo de produção [4], [5]. O principal objetivo da aquicultura é recorrer a técnicas que visem o aproveitamento dos recursos disponíveis para maximizar a produção, e assim satisfazer a procura.

Segundo um relatório da FAO (*Food and Agriculture Organization*) sobre o estudo da pesca e aquicultura em 2018, no mundo, a média anual do consumo de peixe é a mais elevada já registada, e superou o consumo de carne produzida a partir de bovino, ovino, suíno e aves [6], [7].

Na Europa, a aquicultura representa aproximadamente 20% da produção de peixe e tem vindo a aumentar [4], [5]. As espécies mais produzidas por esta técnica são os bivalves e outros moluscos, seguidos pelo salmão.

Em Portugal, a produção de organismos aquáticos através da aquicultura, segue o mesmo panorama Europeu. Por exemplo, no ano de 2017 registou-se um aumento de 11,5% na produção em aquicultura comparada com o ano anterior. Segundo o plano estratégico português para a aquicultura (2014-2020), prevê-se um aumento da capacidade produtiva de 25 000 toneladas, até 2023 [3].

1.1.1 - Tipos e regimes da aquicultura

A aquicultura pode ser classificada segundo o tipo de estabelecimento, o tipo de água e o regime de exploração [3]. O tipo de estabelecimento pode ser dividido em unidades de produção e de engorda. Tal como os nomes indicam, as primeiras são utilizadas para criar os ovos, larvas, juvenis ou esporos, que posteriormente seguem para as unidades de engorda, onde ocorre o crescimento e engorda dos mesmos. As unidades de engorda podem ainda ser classificadas de acordo com a sua localização, à superfície da água, no leito do mar ou rio, ou em terra sendo

flutuantes, em viveiros ou em tanques, respetivamente. Em relação ao tipo de água, a aquicultura pode ser classificada como aquicultura de água doce, marinha ou salobra, consoante o nível de salinidade.

Segundo o regime de exploração, a aquicultura pode ser classificada como extensiva, semi-intensiva e intensiva [8]. O regime extensivo de produção recorre à utilização das condições naturais disponíveis e utiliza uma alimentação exclusivamente natural. O regime semi-intensivo recorre à reprodução artificial e à alimentação natural com auxílio de suplementos alimentares artificiais, para otimizar o crescimento e aumentar o rendimento. O regime de exploração intensivo é um sistema com grande densidade de produção, mais de 200 Ton/ano, que recorre à alimentação por ração (artificial) e utiliza um grande volume de água [9]. Pode ser praticado em circuitos abertos (*flow through*) bem como em circuitos semifechados e fechados (sistemas de recirculação e reuso de água). Nos circuitos abertos, a água fresca entra no sistema para as unidades de cultura e segue para as unidades de descarga da água [9]. Nos sistemas de reutilização de água são utilizados normalmente vários tanques seguidos, de forma a que a água fresca entre no primeiro tanque e prossiga para o seguinte por gravidade. Nos sistemas de recirculação de água ou circuitos fechados, são requeridas menores quantidade de água que nos anteriores, mas são mais exigentes tecnologicamente. Nos sistemas fechados a água sofre processos de tratamento antes de reentrar nos tanques de produção [10]. Os principais processos de tratamento são: ozonização, filtração, nitrificação e fotodegradação. O processo de ozonização consiste na desinfecção da água com ozono enquanto a nitrificação é um género de filtração realizada em bio filtros, onde a amónia, que é muito toxica, é convertida em nitrato [10]. A fotodegradação é um processo complementar à ozonização que consiste na degradação de contaminantes. Pode ainda sofrer processos de aeração com o intuito de aumentar a quantidade de oxigénio na mesma.

1.2 - Antibióticos

Na Europa, em 2012, foram consumidos 3400 toneladas de antibióticos para o uso humano e veterinário, uma média de 130,8 toneladas por país [11], [12]. Em Portugal, no ano de 2012 foram consumidos cerca de 239,5 toneladas de substância ativa, dos quais 83,0 toneladas para a medicina humana e 156,5 toneladas para a medicina veterinária.

Os antibióticos são definidos como compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias [13]. Estes podem ser classificados com base:

- No espectro atividade, como sendo de amplo ou pequeno espectro, consoante a quantidade de espécies que são eficazes;
- No mecanismo de ação como bactericidas, quando causam a morte da bactéria ou como bacteriostáticos, quando inibem o seu crescimento;

- Na sua estrutura química, dividindo-se em classes, onde geralmente os antibióticos que pertencem a mesma classe tem um mecanismo de ação e espectro de atividade semelhante.

A Tabela 1 apresenta as principais classes de antibióticos existentes [14]–[16]. O crescimento da aquicultura, tem sido acompanhado pelo aumento da aplicação de antibacterianos [4], [17].

Os antibióticos na aquicultura podem ser administrados de três formas distintas: por injeção, por banho de imersão e por via oral, sendo esta última a preferida [4], [18]. Na Tabela 2, estão apresentadas as principais características destas três formas de administração. A utilização de antibióticos na aquicultura está associada à prevenção e ao tratamento de doenças em peixes e invertebrados, e surge como consequência da redução das defesas associada a uma cultura com elevada densidade. As quinolonas e as tetraciclina são os antibacterianos mais amplamente administrados. A utilização de antibióticos na aquicultura não é necessariamente um aspeto negativo, uma vez que assegura a qualidade e segurança dos organismos e a saúde dos consumidores. No entanto o uso abusivo e inapropriado destes, tem um impacto negativo, originando dois grandes problemas ambientais: a contaminação dos recursos hídricos e o aparecimento de resistência bacteriana [4], [6], [17].

Tabela 1 - Principais classes de antibióticos existentes, a sua classificação e mecanismo de ação [14]–[16].

Classe de antibióticos	Classificação	Mecanismo
Tetraciclina	Bacteriostáticos	Inibe a síntese proteica, impedindo a ligação RNA transportador ao complexo formado pelo RNA mensageiro. Impede o crescimento
Quinolonas Fluoroquinolonas	Bactericida	Impede a replicação do DNA, inibindo a ação das subunidades “A” da DNA- girasse, enzima que atua na divisão celular. A inibição da enzima descontrola a síntese do mRNA mensageiro e proteínas levando à morte.
Sulfonamidas	Bacteriostáticos	Inibe competitivamente a síntese proteica, impedindo que o DNA bacteriano seja replicado e as proteínas sejam sintetizadas.
Aminoglicosídeos	Bactericida	Inibe a síntese proteica, ligando-se a subunidade 30S do ribossoma
Macrolídeos	Bacteriostáticos ou bactericida	Inibe a síntese proteica, impedindo a ligação do RNA transportador. Em pequenas doses tem uma ação bacteriostática e em doses elevadas bactericida
Beta-lactâmicos	Bactericida	Inibem a síntese da parede celular das bacterias

Tabela 2 - Métodos de administração dos antibióticos na aquicultura e suas principais características [4], [19], [20].

Características	Formas de administração		
	Injeção	Banho de imersão	Oral
Mão de obra	Elevada	Baixa	Baixa
Tempo	Elevado	Médio	Baixo
Eficiência da dosagem	Muito eficaz	Pouco eficaz	Pouco eficaz
Quantidade de fármaco a utilizar	Baixa	Elevada	Médio
Custo	Elevado	Muito elevado	Médio
Utilização	Pouco frequente	Pouco frequente para tratamento de doenças. Muito frequente como marcador.	Muito frequente

1.2.1 - Antibióticos permitidos

O uso de antibióticos na aquicultura na Europa está sujeito a legislação. Cabe às agências de medicamentos de cada país, em conjunto com a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e à Comissão Europeia, a regulamentação de medicamentos para uso humano e veterinário no espaço económico Europeu [21], [22]. Atualmente existem 304 produtos veterinários médicos autorizados na União Europeia, sendo que 29% dos produtos autorizados são antibióticos [23]. Na Tabela A1, em anexo, estão representados os antibióticos utilizados como agentes ativos utilizados para peixes na Europa [22]. Na Europa, cerca de 86,65% dos medicamentos utilizados em animais para a produção de alimento, como os peixes, são compostos apenas por um agente ativo, sendo que a maioria dos medicamentos para peixes são destinados ao salmão e à truta de arco-íris. Em Portugal o hidrocloreto de oxitetraciclina é o mais utilizado para peixes.

1.2.2 - Antibióticos no meio ambiente

A utilização de antibióticos é uma prática comum nos dias de hoje, sendo extensivamente utilizados na medicina humana, veterinária e na aquicultura [24], [25]. A sua ampla utilização associada com o uso abusivo e inapropriado, a elevada taxa de antibiótico não metabolizado (cerca 25-75% dos antibióticos administrados são excretados de forma inalterada pelos organismos, permanecendo inalterados e ativos)[26], e ainda a ineficácia dos tratamentos para eliminar os antibióticos nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARS) leva ao aparecimento de quantidades residuais no ambiente, na ordem dos $\mu\text{g/L}$ e ng/L [27]. Na aquicultura, cerca de 30% dos antibióticos administrados via oral não são consumidos, isto associado à taxa não metabolizada resulta em que aproximadamente 80% dos antibióticos administrados entram no meio ambiente com a sua atividade intacta [4], [26]. Na Figura 1, estão apresentadas algumas das possíveis rotas dos antibióticos no meio ambiente. Estas quantidades residuais no ambiente podem vir a contaminar

águas superficiais e profundas por via direta ou de forma indireta por escoamento superficial, lixiviação e dessorção de solos e sedimentos, podendo vir a alcançar a água potável [1], [28], [29].

O comportamento e o destino dos antibióticos no meio ambiente depende das condições ambientais e de algumas propriedades destes, tais como [1]; da estrutura molecular da molécula, da polaridade, da constante de ionização, solubilidade em água, do coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), do coeficiente de sorção ou distribuição sólido água (K_d), volatilidade e persistência. Antibióticos, como as fluoroquinolonas e as tetraciclina, que apresentam coeficientes de partição octanol-água baixos, são relativamente hidrofílicos e tendem a apresentar uma alta solubilidade em água. Estes antibióticos tendem ainda a formar complexos com iões divalentes, como o Ca^{2+} e Mg^{2+} e a ser absorvidos em solos e sedimentos, levando à sua persistência no ambiente [30]. Esta é uma das maiores preocupações com estas duas classes de antibióticos, uma vez libertados nas águas superficiais são acumuladas nos solos e nos sedimentos, atrasando a sua degradação e prolongado o contacto com os microrganismos, favorecendo assim o aparecimento da resistência bacteriana.

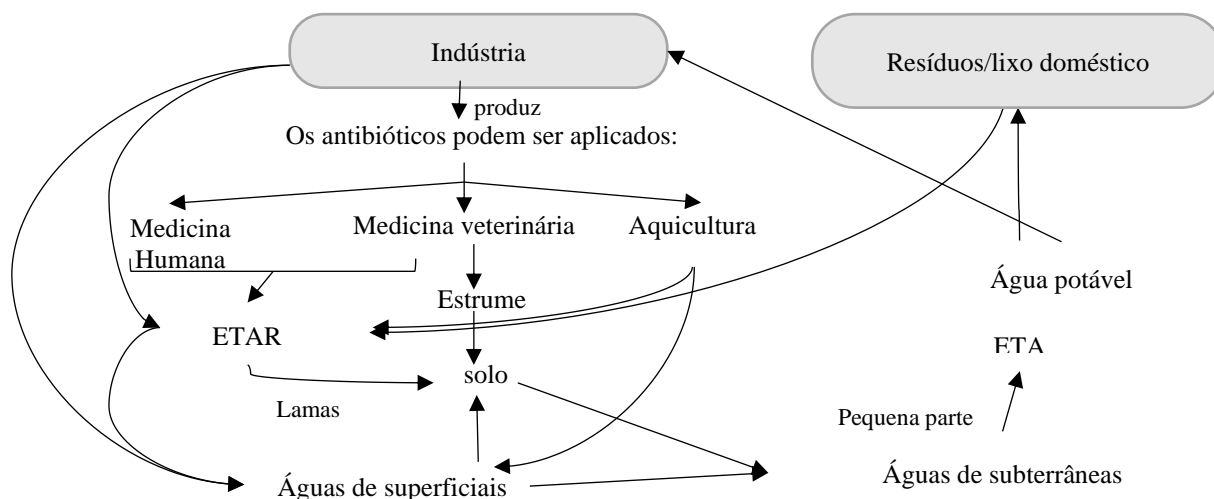


Figura 1 - Origem e possíveis rotas dos fármacos no ambiente (adaptado de Kummerer 2003 [28]).

Na Tabela 3, encontram-se algumas das concentrações da oxitetraciclina encontradas no ambiente, na Europa.

Tabela 3 - Concentrações da oxitetraciclina no ambiente, encontradas na Europa.

Concentração média	Matriz	País	Referência
11,9 ng/L	Águas superficiais	Portugal	[1]
15,7 ng/L	Rio Douro	Portugal	[1]
305 ng/Kg	solo	Alemanha	[30]
32 ng/L	Água superficiais	Alemanha	[30]
340 ng/L	Águas superficiais	Alemanha	[26]
19,2 ng/L	Águas superficiais	Alemanha	[26]
4,49 ng/L	Águas superficiais	Inglaterra	[31]
41 ng/L	Águas superficiais	Espanha	[31]
1,1 ng/L	Águas superficiais	Itália	[31]

1.3 - A Oxitetraciclina

A oxitetraciclina (OTC) ou (4 S, 4 a R, 5 S, 5 a R, 6 S, 12 a R) -4- (dimetilamino) - 1,5,6,10,11,12 a - hexa - hidroxí -6-metil-3, 12-dioxo-4,4 a, 5,5 a -tetra-hidrotetraceno-2-carboxamida (nome IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada) [32] é um antibiótico da classe das tetraciclina (Figura 2) [33]. As tetraciclina constituem um grande grupo de antibióticos que é obtido por fermentação de fungos que atuam sobre bactérias *gram* positivas e *gram* negativas [34]. A oxitetraciclina é um derivado das tetraciclina, um dos mais utilizados na aquicultura na Europa, e o mais utilizado em Portugal [10], [35]. Foi a segunda da sua classe (tetraciclina) descoberta em 1950 por *Alexander Finlay* em amostras de solo, comercialmente chamada de terramicina, sendo produzida a partir do processo de fermentação da *actinomicetos Streptomyces rimosus* [36].

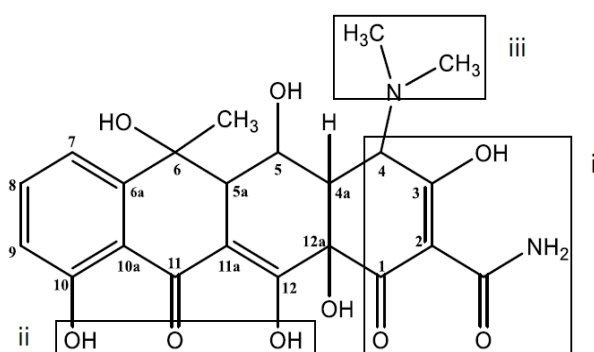


Figura 2 - Estrutura química da OTC; i- sistema tricarbonilo; ii- sistema de dicetona fenólica; iii- grupo dimetilamina (adaptada de AliAbadi 1998 [33]).

A oxitetraciclina apresenta-se como um pó cristalino amarelo, inodoro, higroscópico, de sabor amargo e muito reativo. Atualmente é comercializada sob a forma de hidróclorato de oxitetraciclina ($C_{22}H_{25}ClN_2O_9$) [32]. Ao contrário da oxitetraciclina que é pouco solúvel em água, o hidróclorato de oxitetraciclina é solúvel em água, apresentando uma solubilidade de $3,13 \times 10^2$ mg/L a $25^\circ C$ [10]. Na Tabela 4 estão representadas algumas das propriedades do hidróclorato de oxitetraciclina.

Tabela 4 - Algumas propriedades do hidróclorato de oxitetraciclina.

Estrutura molecular	$C_{22}H_{24}N_2O_9.HCl$	[32]
CAS	2058-46-0	[32]
Classe	Tetraciclina	[10]
Massa molecular	$496,9 \text{ g.mol}^{-1}$	[32]
Ponto de fusão	$180^\circ C$	[37]
Constante da lei de Henry (K_H)	$3,91 \times 10^{-26} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$	[38]
Log K_{ow}	-1,12	[38]
Valores de pKa	$pka_1 = 3,22; pka_2 = 7,46; pka_3 = 8,94$	[39]
	$pka_1 = 3,3; pka_2 = 7,3; pka_3 = 9,1$	[40]
	$pka_1 = 3,57; pka_2 = 7,49; pka_3 = 9,88$	[41]

1.3.1 - A oxitetraciclina em solução aquosa

O comportamento da oxitetraciclina em solução depende do pH da solução e da composição da mesma. O pH influencia o estado de protonação e o espectro de absorção. O espectro de absorção altera da zona do vermelho do visível entre 740-625 nm para a zona do visível entre 320 e 450 nm com o aumento do pH [14], [31], [42]. As Figuras 3 e 4 apresentam o esquema do estado de protonação [9], [10], [41], [43]: a OTC existe na forma de catião a pHs inferiores ao valor de $pK_{a1} = 3,57$ e sobre a forma de anião para pHs superiores a $pK_{a2} = 7,49$; para pHs entre $pK_{a1} = 3,57$ e $pK_{a2} = 7,49$ a OTC tem um carácter neutro e um comportamento anfotérico; na forma de anião, a OTC pode apresentar, 1 carga negativa a pHs compreendidos entre $pK_{a2} = 7,49$ e $pK_{a3} = 9,44$ e 2 cargas para pHs superiores a $pK_{a3} = 9,44$. A elevada densidade eletrónica nos anéis quando predominam as cargas negativas atrai muitas espécies reativas como OH. Nos sistemas aquáticos o pH varia ente 6,0 – 9,0, apresentando-se a OTC sob a forma de anião ou neutra [9], [10].

No que se refere à composição, a oxitetraciclina pode formar complexos com iões di e trivalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , e Al^{3+} [13], [14], [42]. Destes, é particularmente favorecida a ligação da oxitetraciclina com os iões de cálcio e magnésio. Isto porque estes iões apresentam constantes de ligação com a OTC superiores aos restantes iões, e são mais abundantes nas águas, do que os restantes. A formação de complexos com estes iões depende do pH, sendo favorecida a pH elevados, quando a OTC se encontra mais desprotonada. Existem ainda estudos que comprovam uma maior afinidade para o ião magnésio do que para o ião de cálcio [44]. A maioria dos complexos com a OTC e os iões metálicos são considerados insolúveis em água na razão de 1: 1 mas solúveis em razões vestigiais.

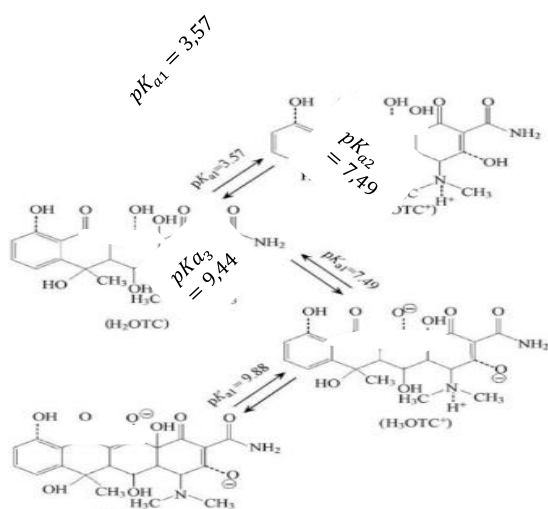


Figura 3 - Representação esquemática do estado de protonação da OTC (adaptado de Shaojun 2008 [41]).

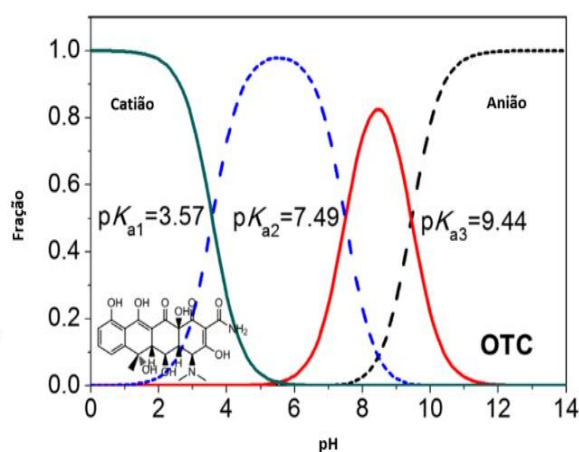


Figura 4 - Representação gráfica do estado de protonação da OTC (adaptada de Peng 2014, [43]).

1.3.2 - Formas de utilização da oxitetraciclina

O hidrocloreto de oxitetraciclina é utilizado para o tratamento de doenças bacterianas em peixes como salmonídeos, peixe-gato do canal, linguado (*Solea*), pregado, dourada (*Sparus aurata*), robalo (*Dicentrarchus labrax*), enguia europeia, carpa comum e Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Habitualmente administrada por via oral a OTC interage com o mRNA, inibindo a síntese de proteínas ao nível da transdução [10], [34]. A dose diária recomendada média é 75 mg/kg [10] de peso de peixe e o máximo administrado por dia é 250 mg/kg de peso de peixe. Um dos grandes problemas do hidrocloreto da oxitetraciclina é que é pouco absorvida pelos peixes e apresenta uma biodisponibilidade menor que 10% [9]. Isto significa que uma grande parte do que é administrado por via oral não é absorvido, sendo excretada intacta, pelas fezes, urina e fluido biliar do peixe. A libertação da OTC dos peixes para a água inicia e termina 2 dias após o início e o fim do tratamento, respetivamente [9].

O hidrocloreto de oxitetraciclina é também utilizado como marcador de estruturas dos peixes, com o intuito de avaliar as ações de armazenamento bem como a idade e o crescimento dos mesmos [42]. Quando utilizada para este fim a oxitetraciclina liga-se aos tecidos calcificados dos peixes exibindo fluorescência quando exposta a luz ultravioleta (UV). É frequentemente administrada por banhos de imersão, que podem variar em tempo, de 6 a 24 h, e em concentração de 0 a 750 mg/L. A marcação com OTC é um processo eficiente para o armazenamento de peixes, uma vez que permanece por mais de 4 anos no peixe [42].

Tendo em conta as doses administradas, e uma densidade de produção de 25 Kg/m³, estima-se que nas águas da aquicultura existam entre 1,88 mg/L-6,25 mg/L de OTC [10].

1.3.3 – Degradação da oxitetraciclina

A oxitetraciclina pertence à classe das tetraciclina, e como tal, apresenta um comportamento semelhante a todos os compostos desta classe. As tetraciclina são suscetíveis de fotodegradação e degradam-se também com o aumento de temperatura [31], [41].

A fotodegradação ou fotólise é favorecida quando a OTC se encontra sobre a forma de anião e inibida quando este se encontra sobre a forma de catião. Apresenta uma cinética de primeira ordem em relação ao pH, na medida que com o aumento de pH também aumentam as constantes cinéticas, ou seja, a fotólise da OTC melhora com o aumento do pH [41], [42].

Nas condições normais das águas superficiais, o pH varia entre 6,0-9,0 [45], a temperatura entre 18-25°C, e o tempo de meia vida da OTC quando exposto à luz solar é de 2,7-6,5 dias [35]. Nestas condições de pH, a OTC encontra-se na forma anfotérica, atravessando membranas com maior facilidade. Como resultado, a absorção da OTC nos organismos aquáticos é favorecida. A estas condições, a OTC é também bem absorvida pelos sedimentos, permanecendo ativa nestes por longos períodos, libertando-se lentamente e sendo a sua degradação retardada.

1.4 - Métodos de detecção de antibióticos em água.

A análise de antibióticos na água apresenta-se como uma tarefa difícil, devido à elevada complexidade das matrizes analisadas e às baixas concentrações nas quais os compostos alvos estão presentes no meio aquático (na ordem dos ng/L). Desta forma, para os detetar, são necessários métodos muito sensíveis, adequados para a monitorização desses analitos em níveis baixos de concentrações, rápidos e fáceis de aplicar. Os métodos de detecção de antibióticos em água dividem-se em duas fases essenciais, uma inicial de pré-tratamento da amostra e uma segunda fase que consiste na análise analítica [24].

A etapa de pré-tratamento da amostra engloba a remoção de interferentes, o ajuste do pH, a adição de um agente quelante seguida da extração em fase sólida e preparação para a etapa seguinte. A extração em fase sólida (SPE do inglês Solid Phase Extraction) é o método mais comum para a remoção de interferentes, porque requer menos trabalho e tempo, e baixos volumes de solvente, alcançando uma maior seletividade e reprodutibilidade para a extração de múltiplos compostos de matrizes aquosas. No entanto, este método, é demorado, não facilitando a monitorização em tempo real e nem sempre permitindo uma recuperação total do analito. Nos últimos anos surgiu uma nova alternativa aos sorventes usuais, a extração em fase sólida com impressão molecular (MISPE do inglês Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction) [11], [46]. Esta técnica recorre a polímeros molecularmente impressos (MIP) para otimizar o uso de sorventes na SPE. A utilização de polímeros molecularmente impressos aumenta a seletividade e permite uma melhor limpeza da amostra antes da análise, removendo eficientemente os contaminantes presentes na matriz da amostra. A utilização de métodos com base na impressão molecular pode diminuir o tempo de análise e diminuir a quantidade de solventes usados, no entanto apresenta alguns problemas que inclui, taxas de recuperação do analito baixas e na seleção do solvente, sendo necessário melhoramentos. Alguns estudos foram realizados com esta técnica para antibióticos como as tetraciclina, sulfonamidas, macrolídeos e fluoroquinolonas [47]–[49].

Após a etapa de pré-tratamento, os métodos analíticos convencionais para a determinação de antibióticos em água incluem uma separação. A técnica de separação preferida é a cromatografia líquida (LC), devido à reconhecida capacidade de atingir alta seletividade, simplicidade de execução e a possibilidade de atingir valores baixos de limites de detecção. A LC permite o acoplamento a vários detetores incluído o de rede de fotódiodos (PDA), de fluorescência (FD), ultravioleta (UV) ou à espectrometria de massa (MS). Apenas a LC-MS permite detetar as concentrações vestigiais dos antibióticos nas águas. O sucesso desta técnica deve-se à elevada eficiência na separação dos componentes de misturas complexas, associada à elevada sensibilidade e seletividade da detecção/quantificação por MS [50]–[53]. Na Tabela 5, encontram-se alguns

estudos realizados com os métodos analíticos convencionais, para a detecção dos antibióticos, nomeadamente da OTC em água.

Contudo, estes métodos apresentam inúmeras desvantagens, tais como: uso de equipamentos caros com custos de manutenção também elevados, como a MS, e exigir solventes na aplicação de técnicas de cromatografia, que para além de dispendiosos apresentam elevada toxicidade para os seres vivos e o ambiente. Além disso, requer ainda mão de obra especializada. Por conseguinte os métodos convencionais não são os mais adequados para o controlo de rotina, pela impossibilidade de análises rápidas, a baixo custo e com baixo impacto ambiental.

A busca de métodos mais adequados para o controlo de rotina, levou ao aparecimento em 2008 e posteriormente em 2019, de sensores óticos acoplados à espectrometria de UV-Vis, para a detecção da OTC (ver Tabela 6). O primeiro sensor recorria a solventes como o metanol, enquanto o segundo utilizava apenas água, uma melhoria significativa na redução do impacto ambiental. Ambos os métodos são rápidos, simples e baratos pois não requerem equipamentos especializados, contudo, o primeiro apresenta a desvantagem de usar um solvente orgânico e o segundo apresenta uma gama de linearidade muito pequena, entre 1 e 5 ppm, o que pode limitar o seu uso nas águas de aquicultura.

Tabela 5 - Estudos realizados para a detecção da OTC em água, nos últimos anos.

Antibióticos	Técnica	Limites de detecção	Referência
CIP/OTC	UHPLC-MS	10-250 ng/L	[54]
Tetraciclina	SPE c/ LC/MS	1-20 ng/L	[55]
Tetraciclina	MISPE c/ LC/MS	0,002-10 µg/mL (OTC) 0,01-10 µg/mL (outras)	[56]
Tetraciclina	SPE c/ HPLC	0,7-6 µg/L	[57]
Tetraciclina	SPE c/ LC/PDA	0,7-3,5 ng/mL	[58]
OTC	LC/MS	2 ng/L – 68 µg/L	[59]
Tetraciclina Quinolonas	SPE c/ LC/MS	210 ng/L – 0,47 µg/L	[60]
Tetraciclina	SPE c/ LC/MS	0,1 µg/L	[61]
ENR/CIP/OTC	SPE c/ HPLC- MS	4-6 ng/L	[62]
Tetraciclina	SPE c/ HPLC	10 µg/L OTC)	[63]

Tabela 6 - Sensores óticos desenvolvidos para determinar a OTC em água de aquicultura, nos últimos anos .[64]

Sensor ótico	2008	2019
Solvente de OTC	metanol	água
Sensibilidade	0,0433 abs/ppm	0,01 abs/ppm
Linearidade	$R^2=0,9989$	$R^2=0,9892$
Limite de detecção	0,5 ppm	0,54 ppm
Gama de linearidade	5,0-4,0 ppm	1,0-5,0 ppm

No entanto, em 2010 foi desenvolvido outro método para detetar a OTC com recurso a sensores químicos, neste caso, sensores potenciométricos [65]. Este estudo tinha como finalidade a deteção de vários antibióticos, entre os quais a OTC em urina, e apresentava limites de deteção de 19,8 $\mu\text{g/mL}$ e sensibilidade de 64,7 mV, não apresentando sensibilidade suficiente para detetar a OTC em águas de aquicultura.

Da análise dos sensores já existentes para detetar a OTC, podemos então concluir que ainda há necessidade de desenvolver novos sensores, mais sensíveis e com gamas de linearidade maiores, que permitam a sua utilização com sucesso em águas de aquicultura.

1.5 - Sensores de massa

Um sensor químico, segundo a IUPAC, é um dispositivo químico que transforma informação química num sinal analítico útil [66].

Os sensores químicos incluem duas partes fundamentais, um recetor e um transdutor [66]. O recetor ou camada sensível/reconhecimento, é a parte sensível a uma determinada característica do sistema, que define a seletividade do sensor, enquanto que o transdutor é a parte responsável por converter essa informação num sinal analítico mensurável. Os sensores químicos são classificados segundo o mecanismo de transdução em óticos, eletroquímicos, elétricos, de massa, magnéticos e térmicos.

Neste trabalho irei focar-me nos sensores químicos de massa. Este tipo de sensores, transformam uma alteração da massa na superfície recetora numa alteração de uma propriedade do recetor, e têm como base o efeito piezoelétrico [66]. Estes podem ser classificados segundo o tipo de onda, podendo ser, de onda acústica de massa (bulk acoustic wave-BAW) ou de onda acústica de superfície (surface acoustic wave- SAW) [67]. A principal diferença entre estes, é a propagação da onda, que no primeiro ocorre no interior do material piezoelétrico e no segundo à superfície.

Usualmente o conceito de sensor de químico de massa com base no efeito piezoelétrico, ou sensor de massa piezoelétrico, surge associado aos cristais de quartzo. Os cristais de quartzo pertencem a uma das classes de materiais que apresentam piezoelectricidade. Segundo a IUPAC, a piezoelectricidade é uma propriedade que só está presente em materiais sem centro de simetria, orgânicos e inorgânicos e é definida como a capacidade de quando aplicado uma tensão mecânica, uma força externa, se obter uma polarização elétrica, e vice-versa. Quando a polaridade da perturbação mecânica varia, varia também a polaridade do campo elétrico gerado [68]. Por outras palavras, um cristal quando ativado por uma carga elétrica, vibra mecanicamente por um curto período [69]. Esta vibração cria uma frequência, que é possível medir através de um frequencímetro.

Os corpos piezoelétricos, podem ser modelados por um circuito equivalente. Na Figura 5 [70] é apresentado o modelo de um circuito equivalente para cristais piezoelétricos proposto por Van Dyke, onde o condensador em paralelo (C_0) representa a capacidade entre os elétrodos do cristal e os fios que fazem as ligações, o condensador em série (C_1) representa a energia elástica armazenada no cristal, a indutância (L_1) da bobine representa a medida de inércia relacionada com a massa em vibração e, por fim, a resistência (R_1) que corresponde à perda da energia mecânica dissipada através do meio. A impedância é a razão entre a tensão aplicada no cristal e a corrente que o atravessa. Algumas características provenientes desta propriedade são a frequência a impedância mínima (f_{min}), a frequência a impedância máxima (f_{max}) e as frequências a fase zero, a frequência de ressonância em série (f_s) e frequência de ressonância em paralelo (f_p) [69], [71].

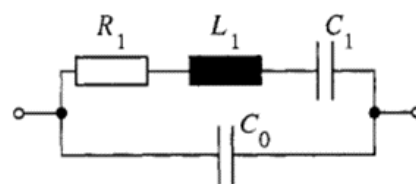


Figura 5 - Circuito elétrico equivalente, proposto por Van Dyke que modela um cristal piezoelétrico de quartzo. R_1 representa a resistência, C_1 e C_0 a capacidade e L_1 a indutância (adaptada de Nursalam, 2016 2013, [71]).

Os cristais de quartzo são os cristais piezoelétricos mais comuns e os mais utilizados como sensores piezoelétricos. Para além da piezoelectricidade, estes apresentam um conjunto de características (insolubilidade em água, inércia, resistência a temperaturas elevadas sem alterar as suas propriedades piezoelétricas), que os tornam únicos e apropriados para o uso como sensores [69], e levaram ao desenvolvimento das microbalanças de cristais de quartzo.

O cristal piezoelétrico comercial é constituído por um fino disco de cristal de quartzo, dois elétrodos de um metal, um em cada lado do cristal e um metal de conexão. Quando aplicada uma corrente elétrica alternada no cristal através dos elétrodos, este vibra à sua frequência natural de ressonância. A frequência natural de ressonância depende das dimensões físicas do disco do cristal de quartzo. Os cristais de quartzo disponíveis comercialmente são fabricados a partir de cristais únicos cortados em ângulos específicos ao eixo ótico principal para formar os discos de quartzo [71]. Usualmente, é utilizado um cristal de quartzo com corte AT sobre a forma de discos de diâmetro contido entre 10 a 15 mm e com aproximadamente 0,2 mm de espessura [72]. Consoante o tratamento superficial utilizado o cristal pode apresentar uma superfície rugosa ou polida. No centro de cada face são colocados elétrodos de metal, geralmente de ouro ou prata, como demonstrado na Figura 6 [73].

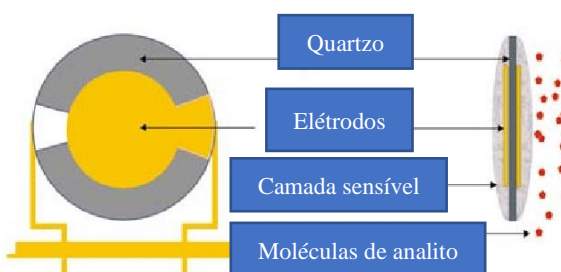


Figura 6 - Representação esquemática de uma microbalança de cristais de quartzo (adaptado de Koszinowski 1980, [74]).

Um cristal de quartzo com estas características oscila a uma frequência natural de ressonância, quando ocorre uma variação de massa na superfície do cristal há uma variação da frequência de vibração. Segundo *Sauerbrey*, esta variação de frequência é linearmente proporcional à massa depositada no cristal, como podemos ver pela Equação 1 [71].

$$\Delta F_q = -2.26 \times 10^{-6} \times F^2 \times \frac{\Delta M}{A} \quad (1)$$

Onde, ΔM é a variação de massa do cristal (g), A a área do cristal de quartzo (cm^2) e F a frequência (MHz). Esta equação está limitada a filmes finos, rígidos e uniformemente distribuídos na área ativa do cristal. Diversos tipos de compostos podem ser usados como elemento de reconhecimento ao analíto a determinar, sendo um dos mais interessantes e vantajosos, os polímeros molecularmente impressos.

1.5.1 - Polímero molecularmente impresso (MIP) como elemento de reconhecimento

Polímeros molecularmente impressos (MIPs) são polímeros preparados na presença de uma molécula molde, onde se criam cavidades específicas com locais de ligação complementares a uma determinada molécula, permitindo que os MIPs a reconheçam seletivamente. Os polímeros molecularmente impressos podem ser aplicados a um grande número de moléculas molde e apresentam inúmeras vantagens, tais como; tem uma grande afinidade para a molécula molde, apresentam estabilidade e resistência térmica e química e o seu processo de síntese é pouco dispendioso e simples [74]–[76]. Para a síntese de um MIP recorre-se a uma molécula molde (MM), um monómero funcional (MF), um agente de reticulação (ALC), um solvente (S) e um iniciador (I), bem como a diferentes abordagens, tipos e mecanismos de polimerização [74], [76].

1.5.1.1 - Abordagens de impressão molecular

Na preparação do polímero molecularmente impresso seguem-se duas abordagens principais distintas; abordagem covalente, ou não covalente. O que distingue o tipo de abordagem é o tipo de ligação que o monómero funcional faz com a molécula molde, no momento da formação e no momento de reconhecimento [74], [76]–[79].

Impressão covalente

A impressão covalente surgiu em 1970 na Alemanha. Na abordagem covalente o complexo monómero funcional-molécula molde (MF-MM) é formado por ligações covalentes, sendo também covalente a ligação do MIP às moléculas molde. A principal vantagem desta abordagem é a formação de complexos MF-MM estáveis e estequiométricos e a grande variedade de condições de polimerização que podem ser aplicadas.

Impressão não covalente

A impressão não covalente é a abordagem mais utilizada para a preparação de MIPs e surgiu em 1980 [76]. O que a diferencia da anterior é o tipo de ligação que se estabelece entre o MF e o MIP, com a MM. Nesta abordagem, predominam as ligações não covalentes como as ligações por pontes de hidrogénio, interações iónicas, π - π , hidrofóbicas e as forças de *Van der Waals*. A cinética de associação/dissociação dos MIPs com esta abordagem é no geral mais rápida que a impressão covalente, sendo esta uma das vantagens da preparação do MIP com esta abordagem. Apresenta ainda como vantagens a fácil preparação do complexo MF-MM, a fácil remoção da molécula molde do MIP, e a ligação rápida do MIP às moléculas molde (MM), bem como o potencial de ser aplicada a um grande número de moléculas molde. Como desvantagem apresenta uma menor seletividade que a abordagem anterior [80].

Alguns investigadores consideram ainda a possibilidade de uma abordagem semi-covalente [74], [80]. Esta é uma abordagem mista, que inclui a formação dos complexos MF-MM por interação covalente, e a subsequente ligação ao polímero por interações não covalentes. Esta nova abordagem combina as vantagens das duas anteriores: a estabilidade e estequiometria do complexo MF-MM bem como a rapidez da associação/dissociação dos MIPs da abordagem não covalente.

1.5.1.2 - Síntese de polímeros molecularmente impressos

O processo de síntese de um MIP é composto por três etapas. Inicialmente forma-se um complexo entre a MM e o MF, segue-se a polimerização do conjugado MF-MM, e por fim a remoção da molécula molde do material polimérico [81]. Após a remoção da molécula molde, o MIP sofre um processo de secagem. Depois de concluído todo este processo, os locais de ligação do MIP, que são complementares à molécula molde em forma, tamanho e posição dos grupos funcionais, encontram-se disponíveis [74], [76], [78].

Na síntese dos MIPs é usualmente utilizado, dependendo do mecanismo de polimerização, uma molécula molde, um ou mais monómeros funcionais, um agente de reticulação, um solvente e um iniciador.

A molécula molde (MM) tem um papel fundamental na polimerização de um polímero molecularmente impresso, pois para além de funcionar como molde, é esta que determina qual é o monómero a utilizar. Uma das características fundamentais desta, é que deve ser quimicamente inerte nas condições de polimerização. Moléculas molde de grandes dimensões são usualmente menos rígidas o que não facilita a criação de cavidades do MIP bem definidas.

Uma vez que a interação entre a MM e o MF tem de ser favorecida, a escolha deste último, é crucial para a síntese do MIP. O MF é responsável por interagir com a molécula molde fornecendo os grupos funcionais para os locais de ligação e é o tipo de ligação entre estes dois que determina o tipo de abordagem. A associação entre a MM e o MF funciona por equilíbrio e a distribuição dos

locais de ligação no polímero é heterogênea e depende do crescimento dinâmico da cadeia bem como da razão entre o monómero funcional e a molécula molde. Esta razão depende do tipo de abordagem. Para uma abordagem não covalente, a concentração vai influenciar o número de locais de ligação. Usualmente é utilizada uma razão de 1:4 com um excesso de MF, no entanto esta tem de ser estudada para cada caso específico. Para a síntese de um MIP pode ser utilizado mais do que um monómero. Nestes casos específicos é preciso ter em consideração as razões de reatividade dos monómeros para assegurar que a copolimerização é executável [81].

A seletividade é muito influenciada pelo tipo e pela quantidade de agente de reticulação (ALC) utilizado na síntese do MIP. Este desempenha três funções fundamentais: controla a morfologia da matriz do polímero, estabiliza os locais de ligação do MIP e fornece estabilidade mecânica ao MIP. Em excesso, o ALC diminui a quantidade de MF por unidade de massa, em insuficiência não permite que a cavidade do MIP se aguarde num estado estacionário estável. A quantidade ótima a utilizar do agente de reticulação, deve ser alta o suficiente para manter a estabilidade e os locais de reconhecimento intactos, e usualmente é utilizado um excesso de 80%. É ainda de salientar que em determinadas condições, alguns ALC são capazes de simultaneamente funcionar como monómeros [81].

O solvente atua simultaneamente como gerador de poros para melhorar o acesso aos locais de ligação e como meio onde ocorre a polimerização. Desta forma, todos os componentes de uma polimerização devem ser solúveis no solvente, não podendo o mesmo interferir na formação do complexo MF-MM. A escolha do solvente depende da abordagem escolhida. Numa abordagem covalente podem ser usados vários tipos de solventes desde que dissolvam os restantes componentes, no entanto para uma abordagem não covalente, o solvente, para além de dissolver os restantes componentes, tem de promover a formação do complexo inicial. Usualmente, isto implica que polímeros apolares e apróticos sejam preferíveis, pois estabilizam as ligações por pontes de hidrogénio. A presença ou ausência do solvente determina a porosidade do MIP formado. Os polímeros quando preparados na ausência de solvente tornam-se densos, ao passo que, na presença de solvente tornam-se porosos.

O iniciador é o responsável por iniciar a polimerização radicalar. Geralmente gera o primeiro radical por decomposição térmica ou fotólise e é usualmente utilizado em baixas concentrações.

A maioria dos MIPs são sintetizados por uma abordagem não covalente com o ácido metacrílico como monómero, devido ao grupo carboxilo que é o mais comum para a ligação por pontes de hidrogénio e com o dimetacrilato de etilenoglicol como agente reticulante [74], [76], [78], [81].

Mecanismo de polimerização

A escolha do mecanismo, da abordagem e do tipo de polimerização depende da aplicação final, uma vez que o formato do MIP influencia a capacidade e a acessibilidade dos locais de ligação no polímero. Quando estes são utilizados como elementos de reconhecimento, como se pretende, o tamanho e o formato também influenciam o tempo de resposta. O mecanismo de polimerização mais utilizada, é a polimerização por radicais livres, um tipo de polimerização por adição, com uma abordagem não covalente. É uma reação rápida que utiliza iniciadores azo e iniciação térmica ou fotoquímica. O mecanismo da polimerização por esta técnica para a síntese de MIP é semelhante a qualquer outra polimerização típica por radicais livres, e é caracterizado por três fases: (1) iniciação, (2) propagação, (3) terminação. A primeira fase subdivide-se em duas fases: na formação de radicais livres e a sua adição aos monómeros presentes. A segunda fase corresponde ao crescimento da cadeia por adição rápida e sequencial e por fim, a terceira fase, a terminação, ou seja, ao término do crescimento da cadeia. O término do crescimento da cadeia pode ser essencialmente por combinação (combinação de duas cadeias) ou por desprotonação (transferência de H de uma cadeia para outra alterando a sua configuração). Dois factos que são particularmente importantes e merecem realce: o primeiro é que a velocidade de propagação numa típica polimerização por esta técnica é muito mais rápida que a velocidade de iniciação, o que significa que a partir do momento que inicia a reação, a cadeia cresce muito rapidamente para pesos moleculares elevados num período muito curto de tempo; o segundo é que a fonte de radicais livres está ativa durante toda a polimerização. Para a realização desta técnica de polimerização é necessário, entre outros, um controlo de temperatura e uma atmosfera inerte, com ausência de O₂. Isto porque o oxigénio pode inibir as reações captando os radicais e provocar a polimerização com alguns monómeros e/ou impurezas dando origem a produtos indesejados [74], [82], [83].

Tipos de polimerização

Existem vários tipos de polimerização, para a síntese de MIP, sendo o mais comum a polimerização em solução. Na Tabela 7 estão resumidos os principais métodos de polimerização em solução bem como as suas características. Na Tabela 8 são apresentadas as receitas de síntese de MIP para OTC encontrados na literatura, independentemente da utilização a que se destinavam. Foram encontradas 5 receitas, como se pode visualizar na Tabela 8. Exclui-se deste estudo o MIP-5, uma vez que utiliza peróxidos para a sua síntese, compostos muito perigosos e de utilização proibida no Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Todas elas usavam o mesmo monómero e iniciador, diferindo no agente de reticulação, solvente ou condições experimentais. Na Figura 7, mostra-se, em esquema, a formação do MIP para a OTC [75], [76], [79], [83].

Tabela 7 - Principais métodos de polimerização em solução, as suas características e desvantagens [74], [78], [83].

Métodos	Características	Desvantagens
Polimerização em massa	Mais usado; Rápido; Simples; Não requer equipamento especializado ou dispendioso; Elevado grau de pureza;	Não uniforme; Rendimentos baixos; Partículas irregulares em forma e tamanho;
Polimerização por suspensão	Partículas esféricas; Resultados reprodutíveis;	Microesferas de baixo reconhecimento; tamanho heterogéneo; necessário um surfactante; solvente é a água;
Polimerização por emulsão	Método eficaz; alto rendimento; aplicado com sucesso a proteínas; forma partículas monodispersas	O MIP pode conter restos de surfactante
Polimerização por precipitação	Simples; obtenção de partículas esféricas; excelente controlo de tamanho das partículas; elevada qualidade, partículas uniformes; elevado rendimento	São necessárias quantidades elevadas de Molécula Molde:

Tabela 8 - Lista de receitas de síntese de MIPS para detetar a OTC.

MIP	Artigo	Tipo de polimerização	Aplicação
MIP-1	[84]	Polimerização em massa	Aplicação em SPE (MISPE) para deteção por HPLC em matrizes biológicas.
MIP-2	[85]	Polimerização por precipitação	Aplicação em SPE (MISPE) para deteção por HPLC em amostras alimentares
MIP-3	[86]	Polimerização por precipitação	Aplicação em SPE (MISPE) para detetar por HPLC
MIP-4	[87]	Polimerização em massa	Aplicação em métodos de diálise para a deteção de antibióticos em água.
MIP-5	[65]	Polimerização em massa	Aplicação em Sensores potenciométricos para analisar drogas na urina.

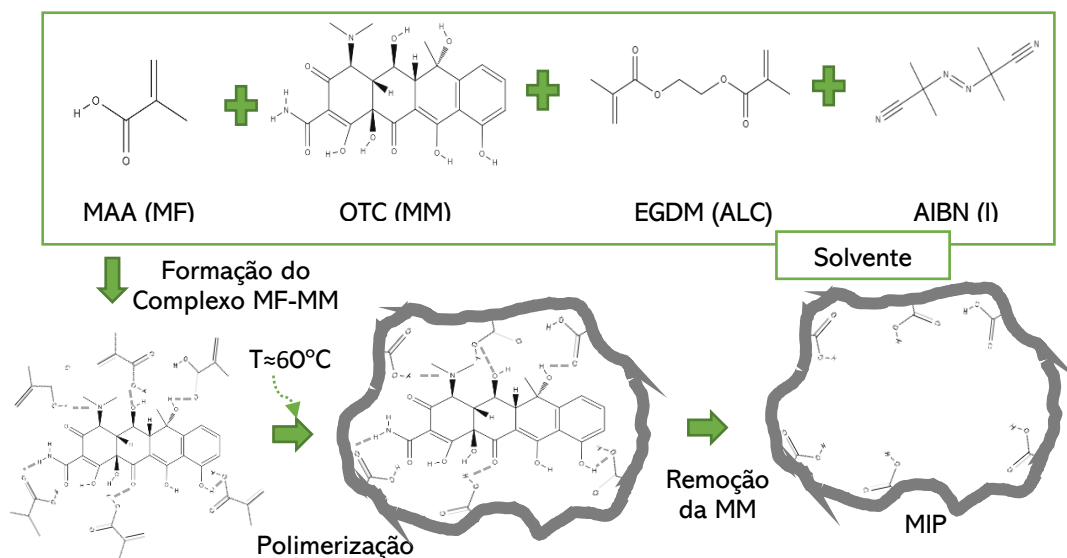


Figura 7 - Representação esquemática da síntese do polímero molecularmente impresso para OTC.

Neste trabalho pretende-se, sintetizar os MIPs já existentes na literatura para a OTC e utilizá-los como camada de reconhecimento em sensores de massa. Estes sensores de massa serão testados com soluções de OTC assim como na presença dos possíveis interferentes em águas de aquicultura.

Pretende-se deste modo desenvolver um sensor de massa capaz de detetar a OTC para valores encontrados em águas de aquicultura.

2 - Materiais e métodos

Esta secção do trabalho tem como foco a parte experimental. Aqui serão enumerados os reagentes utilizados, o equipamento, os métodos e os procedimentos experimentais usados para a execução deste trabalho.

2.1 – Reagentes e químicos:

Todos os solventes utilizados eram de grau analítico e todas as soluções de trabalho foram preparadas diariamente, utilizando água ultrapura (Milli-Q). O hidrocloreto de oxitetraciclina (OTC, J62489), a tetraciclina (TC, T3258) e a ciprofloxacina (CIP, J611317) foram obtidos pela Alfa Aesar. A enrofloxacin (ENR, 17849) pela BioChemika e o ácido oxolínico (AO, O0877) pela Sigma. Outros químicos usados neste trabalho foram; ácido metacrílico (MAA, Merck, 8.00578.0100); dimetacrilato de etilenoglicol (EDGMA, Merck, 8.18847.0250); trimetilacrilato de trimetilpropano (TRIM, Fluka, 246840); 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN, Fluka, 11630); dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, D2650); metanol (Merck, 1.06009.1011); acetonitrilo (Sigma, 360457); ácido acético (Sigma, 71251); acetona (Merck, 90872); álcool benzílico (Merck, 1009872500); tetrahydrofurano (THF, Sigma, 34865); policloreto de vinilo de alto peso molecular (PVC, Sigma, 81387); diclorometano (Merck, 106050); éter 2- nitrofenil octílico (NPOE, Merck, 73732); ácido cítrico (Sigma, 251275); sal trissódico de ácido cítrico di-hidratado (Sigma, S4641); ácido fórmico (Merck, 695076); ácido sulfúrico (Merck); HEPES (Sigma, H3375); cloreto de magnésio (Merck 8147330) e o cloreto de sódio (Sigma, S7653).

2.2 - Síntese de MIP

Neste trabalho foram sintetizados MIPs para a OTC, seguindo quatro protocolos da literatura ([84]–[87]), cujos passos principais irão ser descritos em seguida.

MIP-1 - A síntese do MIP que iremos designar por **MIP-1** foi realizada tal como descrita na ref. [84]. A molécula modelo (OTC, 576 mg), o monómero funcional (MAA, 787 µL), o agente reticulante (EDGMA, 8763 µL) e o iniciador (AIBN, 160 mg) foram dissolvidos em 13,33 mL de DMSO, num reator de parede dupla de 25 mL. Esta mistura foi desoxigenada com nitrogénio por 5min, num banho de gelo. De seguida conectou-se um condensador e procedeu-se à polimerização, aquecendo o reator a 60°C durante 24h, com agitação contínua, tal como representado na Figura 8, que apresenta a fotografia da montagem experimental. Terminada a polimerização, retirou-se o MIP, esmagou-se num almofariz e peneirou-se o mesmo com auxílio a uma peneira de 200 µm, tendo-se recolhido a fração que passou através da mesma. De seguida, iniciaram-se os processos de lavagem em *Soxhlet* (Figura 9). Realizaram-se duas lavagens, uma primeira com ácido acético /metanol (1/9 v/v) por 24h, com o intuito de remover as moléculas molde, e uma segunda com

metanol por 12h, a fim de remover o ácido acético. Por fim iniciou-se o processo de secagem do MIP, a uma temperatura de 60°C, até peso constante.

MIP- 2 - Todo o procedimento para sintetizar este segundo MIP, designado por **MIP-2**, foi realizado com base na ref [85]. A molécula modelo (OTC, 497 mg), o monómero funcional (MAA, 509 µL), o agente reticulante (TRIM, 3 mL) e o iniciador (AIBN, 30 mg) foram dissolvidos em 60 mL de uma mistura de metanol e acetonitrilo em partes iguais, num reator de parede dupla de 25 mL. O conteúdo do reator foi desoxigenado com nitrogénio por 5min. De seguida conectou-se um condensador e procedeu-se a polimerização. Esta decorreu a 55°C durante 24h, com agitação continua conforme a Figura 8. Terminada a polimerização iniciaram-se os processos de lavagem pelo *Soxhlet* (Figura 9). Realizaram-se duas lavagens, uma primeira com ácido acético /metanol (1/9 v/v) por 24 h, com o intuito de remover as moléculas molde e uma segunda com metanol por 12h a fim de remover o restante ácido acético. No fim dos períodos de lavagem centrifugou-se a mistura, com uma velocidade de rotação 2000 rpm durante 10min. Por fim iniciou-se o processo de secagem do MIP, a uma temperatura de 60°C até peso constante. Para garantir que todas as partículas eram de tamanho inferior a 200 µm peneirou-se o mesmo com auxílio a uma peneira de 200 µm, tendo-se recolhido a fração que passou através da mesma.

MIP-3 - Todo o procedimento para sintetizar este terceiro MIP, designado por **MIP-3**, foi realizado com base na ref [86]. A molécula modelo (OTC, 99.38 mg), o monómero funcional (MAA, 103 µL) e o agente reticulante (EDGMA, 3964 µL) foram dissolvidos em 30 mL de acetona, num reator de parede dupla de 25 mL, e colocados à temperatura ambiente com agitação continua por 1 hora. Terminado este período foi adicionado o iniciador (AIBN, 40 mg). Em seguida a mistura foi colocada num banho de ultrassons por 10min e logo após este período, desoxigenada com nitrogénio por 10 min. Conectou-se um condensador ao reator e procedeu-se à polimerização. Esta decorreu a 50°C durante 24h, com agitação continua, tal como representado na Figura 8. Terminada a polimerização, retirou-se o MIP e peneirou-se o mesmo com auxílio a uma peneira de 200 nm, tendo-se recolhido a fração que passou através da mesma. De seguida, iniciou-se os processos de lavagem pelo *Soxhlet* (Figura 9). Realizaram-se duas lavagens, uma primeira com ácido acético /metanol (1/9 v/v) por 48h, com o intuito de remover as moléculas molde e uma segunda com metanol por 24h a fim de remover o restante ácido acético. Por fim iniciou-se o processo de secagem do MIP, a uma temperatura de 50°C até peso constante.

MIP-4 - Todo o procedimento para sintetizar este quarto MIP, designado por **MIP-4**, foi realizado com base na ref [87]. A molécula modelo (OTC, 1.39 g), o monómero funcional (MAA, 1035 µL), o agente reticulante (EDGMA, 9.44 µL) e o iniciador (AIBN, 115 mg) foram dissolvidos em 25

mL de acetonitrilo/ álcool benzílico (3/2 v/v), num reator de parede dupla de 25 mL. Em seguida a mistura foi colocada num banho de ultrassons por 5min e logo após este período, foi desoxigenada com nitrogénio por 5min. De seguida, conectou-se um condensador e procedeu-se à polimerização. Esta decorreu a 40°C durante 18h, com agitação contínua, tal como representado na Figura 8. Terminada a polimerização, retirou-se o MIP, esmagou-se e peneirou-se o mesmo com uma peneira de 200 µm, tendo-se recolhido a fração que passou através da mesma.

De seguida iniciou-se os processos de lavagem pelo *Soxhlet* (Figura 9). Realizaram-se duas lavagens, uma primeira com 300 mL de ácido acético /acetonitrilo (1/10 v/v) por 5 dias, e uma segunda com 300 mL de acetonitrilo por 12h. Por fim iniciou-se o processo de secagem do MIP, a uma temperatura de 60°C até se obter uma massa constante.

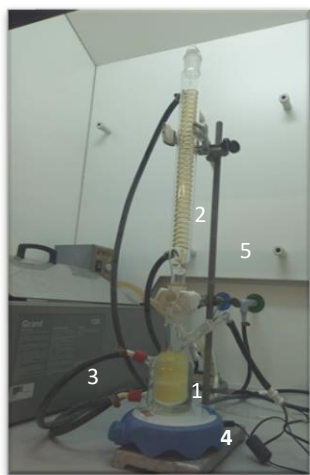


Figura 8 - Fotografia da montagem experimental para a síntese de MIP. 1- reator de parede dupla; 2- condensador; 3- banho; 4- placa de agitação; 5- suporte.



Figura 9 - Fotografia da montagem experimental para lavagem com Soxhlet; 1- manta de aquecimento; 2- balão com solvente extrator; 3- câmara de extração; 4- condensador.

2.3 - Análise do MIP

Todos os MIPS sintetizados neste trabalho bem como a OTC e o monómero funcional foram analisados por um espectrómetro de infravermelho equipado com módulo ATR de diamante (FTIR-ATR). Este foi programado para uma resolução de 4 cm⁻¹ e 32 varrimentos na região do infravermelho médio (4000-600 cm⁻¹).

2.4 – Camada de reconhecimento

A fim de conseguir imobilizar o MIP na superfície de ouro do eléctrodo do cristal piezoelétrico, preparou-se uma suspensão do mesmo numa solução de policloreto de vinilo (PVC) e um plastificante (NPOE) em THF. Num frasco de vidro de 4 mL, colocaram-se 2,53 µL de NPOE, 6,0 mg de MIP e 1,34 mg de PVC de alto peso molecular, que se misturam com o THF. O frasco foi protegido do contacto direto com a luz e foi sempre agitado antes de se usar. Para a aplicação desta membrana na QCM, retirou-se uma alíquota do frasco com auxílio a uma micropipeta e depositou-se a membrana numa das faces da QCM. Deixou-se secar a membrana por um período

mínimo de 24h. Os cristais piezoelétricos de quartzo utilizados nas experiências foram de 9 MHz, com elétrodos de ouro, com corte AT polidos e ou rugosos.

Numa tentativa de relacionar as propriedades elétricas do cristal revestido com a quantidade de MIP presa no PVC plastificado, prepararam-se membranas só com o PVC e plastificante, sem MIP, às quais depois de terem sido caracterizadas eletricamente, se juntaram, num processo que poderemos chamar de sementeira, grãos do MIP em 4 etapas, tendo-se realizado novamente a caracterização elétrica do cristal, após o que se adicionou nova gota da solução de PVC e plastificante e se leram novamente as características elétricas do cristal revestido. A caracterização do cristal após as diferentes etapas de revestimento foi feita lendo-se a impedância e os vários parâmetros do circuito equivalente recorrendo a um Analisador de Redes/Impedância HP4395A com um adaptador de testes de impedância HP4361A.

2.5 - Arranjo experimental

Para o estudo da seletividade e sensibilidade foram construídas curvas de calibração, utilizando o arranjo experimental que se mostra nas Figuras 10 e 11. Para este fim recorreu-se a um sistema de injeção em fluxo (FIA), como método de análise, no qual é usada uma garrafa pressurizada com azoto, como sistema de propulsão do fluido. Neste sistema, o fluido de arraste flui continuamente ao longo do sistema até à célula com o cristal de quartzo, com um caudal de aproximadamente 0,8 mL/min. As alíquotas do padrão ou da amostra são injetadas (com o auxílio de uma seringa) na porta de injeção, que têm uma serpentina de 0,5 mL, sendo arrastadas até à face revestida do cristal, interagindo com esta. O cristal está conectado a um oscilador, que por sua vez está ligado a uma fonte de alimentação e a um frequencímetro, que indica a frequência do cristal, como se observa na Figura 11. O frequencímetro está ligado a um computador, através de uma placa de aquisição, sendo o registo da variação de frequências feito com um programa de aquisição de dados em *LabView* (Figura 10). A injeção de soluções-padrão com diferentes concentrações leva ao respetivo decréscimo de frequências, e permite construir curvas de calibração, e deste modo estudar o comportamento do sensor perante o analito de estudo.

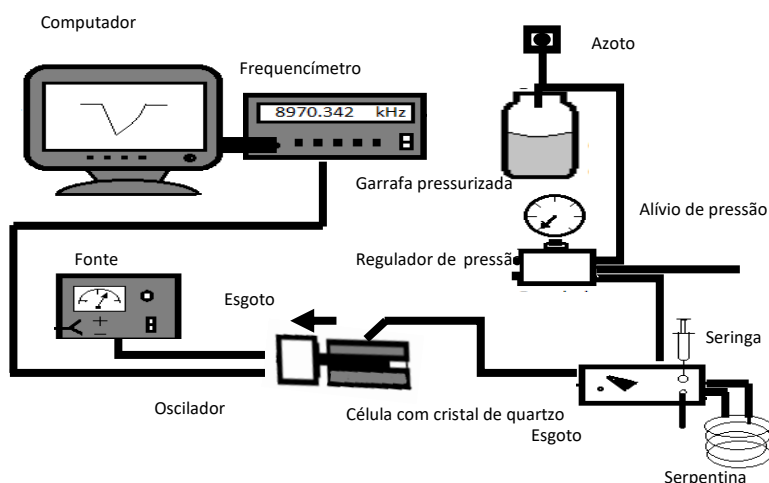


Figura 10 - Representação esquemática do arranjo experimental para o sistema de FIA com detecção por microbalanças de cristais piezoelétricos de quartzo.



Figura 11 - Foto do arranjo experimental para o sistema de FIA com detecção por microbalanças de cristais piezoelétricos de quartzo.

2.6 - Preparação de soluções

Com o intuito de traçar as curvas de calibração, prepararam-se várias soluções padrão com diferentes concentrações do analito a analisar (OTC) ou do interferente. As soluções foram preparadas diariamente a partir de diluições de uma solução mãe.

- Solução mãe de OTC e TC: prepararam-se 25,00 mL de uma solução com uma concentração de 1000 ppm. Para tal, dissolveu-se a quantidade de OTC/TC pretendida em água Milli-Q ou tampão HEPES e perfez-se o volume do balão volumétrico.
- Solução mãe de CIP e ENR: prepararam-se 25,00 mL de uma solução com uma concentração de 500 ppm. Para tal, dissolveu-se a quantidade de CIP/ENR pretendida numa quantidade mínima de HCL 0,1 M e perfez-se o volume do balão volumétrico com água Milli-Q ou solução tampão HEPES.

- Solução mãe de AO: prepararam-se 25,00 mL de uma solução com uma concentração de 500 ppm. Para tal, dissolveu-se a quantidade de AO pretendida em uma quantidade mínima de NaOH 0,03 M e perfiz-se o volume do balão volumétrico com água Milli-Q ou solução tampão HEPES.

As soluções tampão foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q), segundo o procedimento;

- Solução tampão HEPES 0,001M: Preparou-se uma solução de HEPES de 1M, dissolvendo 2,383 g de HEPES em 100 mL de água Milli-Q. De seguida diluiu-se 100 µL da solução anterior em 1 L de água Milli- Q ajustou-se o pH a 7,1 com NaOH.

3 - Resultados e Discussão

Esta secção do trabalho tem como foco os resultados obtidos. Aqui serão apresentados e discutidos todos os resultados obtidos durante a realização do trabalho

3.1 - Comparação dos polímeros molecularmente impressos para reconhecimento da OTC, descritos na literatura

Neste trabalho pretendeu-se analisar o MIP-1, MIP-2, MIP-3 e MIP-4 usados como elementos de reconhecimento para a QCM.

3.1.1 - Composição e morfologia dos polímeros molecularmente impressos

Na Tabela 9 faz-se uma comparação dos reagentes utilizados na síntese dos polímeros molecularmente impressos, com influência direta no formato final do polímero, indicando-se ainda o tipo de polimerização. Salienta-se ainda que todas as polimerizações seguem uma abordagem não covalente.

Tabela 9 - Tabela resumo da síntese de MIP para a OTC, seguindo as diversas receitas descritas na literatura.

Síntese	MAA/ OTC	ALC	ALC (%mol)	Solvente	Volume solvente	P' [88]	Tipo de polimerização
MIP-1 [84]	8,0	EDGMA	83,34	Dimetilsulfóxido	13,33 mL	7.2	Polimerizaçã o em massa (60°C, 24h)
MIP-2 [85]	6,0	TRIM	61,03	Metanol e Acetonitrilo	60 mL (1:1 v/v)	5.5	Polimerizaçã o por precipitação (55°C, 24h)
MIP-3 [86]	6,0	EDGMA	94,34	Acetona	30 mL	5.1	Polimerizaçã o por precipitação (50°C, 24h)
MIP-4 [87]	4,4	EDGMA	80,39	Acetonitrilo e álcool benzílico	25 mL (3:2 v/v)	5.7	Polimerizaçã o em massa (40°C, 18h)

É de salientar que todas as receitas de síntese de MIP, recorrem ao mesmo MF, o ácido metacrílico (MAA). Este é o MF mais utilizado para a síntese de MIP para a OTC, apesar de existirem outras possibilidades como a acrilamida (MIP-5). O MF é o responsável por ceder os grupos funcionais para a ligação à MM, que forma um complexo MM-MF a partir do qual vai ocorrer a polimerização. Neste caso o grupo carboxílico do MAA (o MF) pode formar fortes ligações por pontes de hidrogénio com o grupo hidroxilo e amida da OTC (a MM) tal como podemos observar na Figura 7 do Capítulo 1. A razão MF/MM varia consoante o MIP. Todos as receitas de síntese apresentam um excesso de MF, sendo a receita para o MIP-1 a que apresente o

maior excesso seguida pela dos MIP-2, MIP-3, e por último a do MIP-4. Para uma abordagem não covalente, a razão MF/MM vai influenciar o número de locais de ligação e pressupõem-se que quanto mais elevada esta for, mais locais de ligação apresentará o MIP. Desta pressupõe-se que o MIP-1 apresente um maior número de locais de ligação comparativamente aos restantes.

Uma vez que o MF e a MM são iguais em todas as receitas pressupõe-se que todos os MIPs sintetizados, tenham possibilidade de formar o mesmo tipo de interação com o analito. Desta forma a principal diferença entre os MIPs estará na homogeneidades e granulometria das partículas, no tamanho das cavidades, no seu número e no número de locais de ligação induzidos pela MM e na possibilidade de se formarem ligações de base com o polímero, sem influência da MM. No fundo, na morfologia e na porosidade do MIP.

Com o intuito de obter uma melhor compreensão da identificação e/ou determinação de características estruturais dos MIPS, realizou-se uma análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier associada a refletância total atenuada (FTIR-ATR), dos 4 MIPS, da OTC e do MAA. Nas Figuras 12 a 14 são apresentados os espectros obtidos, dos MIPS, da OTC e do MAA, respetivamente e no anexo C os mesmos em tamanho superior.

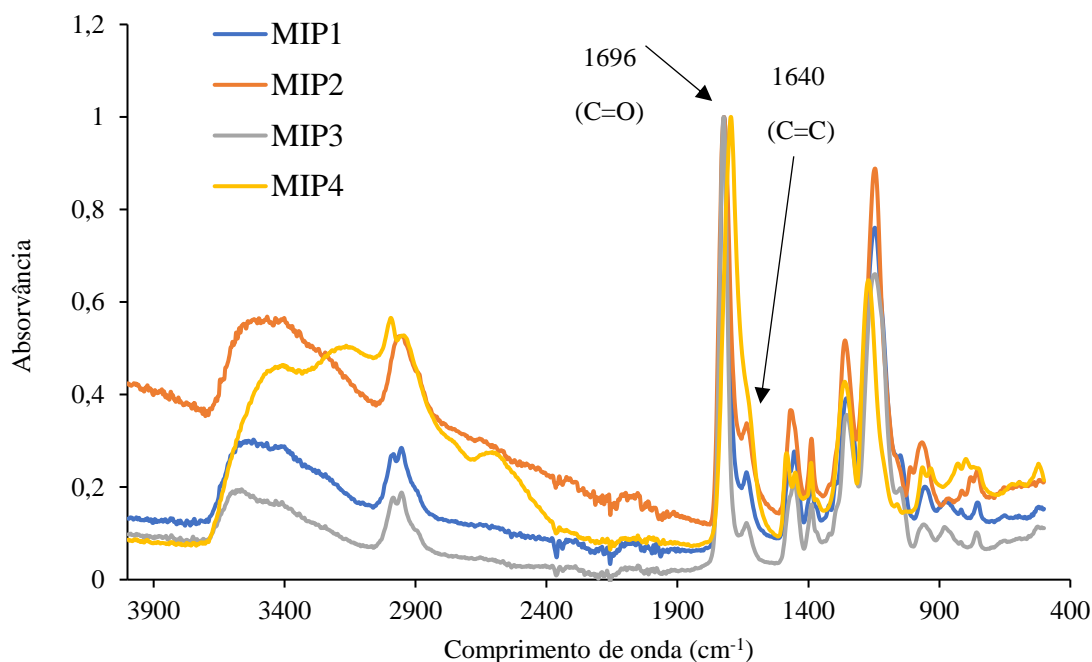


Figura 12 – Espectro obtido por FTIR-ATR dos vários MIPS sintetizados.

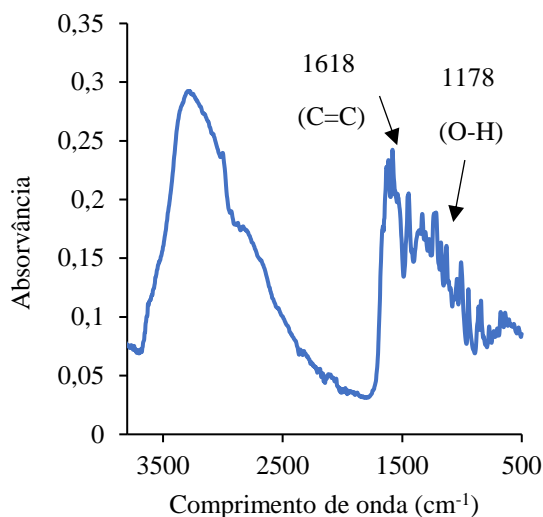


Figura 13 - Espectro obtido por FTIR-ATR da OTC.

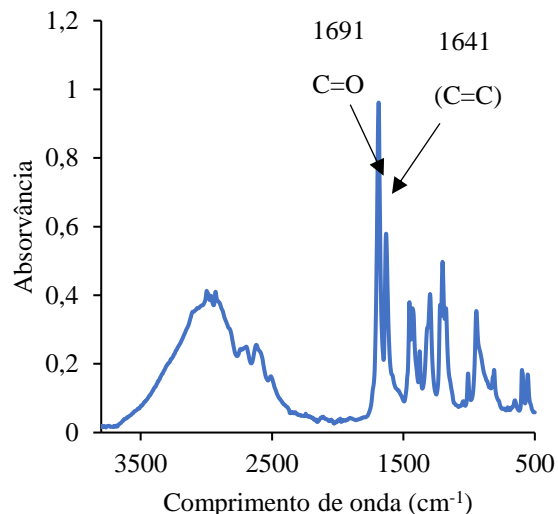


Figura 14 - Espectro obtido por FTIR-ATR do ácido metacrílico

Na Figura 12 podemos observar que os espectros de FTIR-ATR do MIP-1, MIP-2, MIP-3 e MIP-4 são muito semelhantes entre si, e apresentam as principais bandas nos mesmos comprimentos de onda. Todos os espectros apresentam bandas nos comprimentos de onda de 1696 cm^{-1} e 1641 cm^{-1} , que corresponde às ligações C=O e C=C respetivamente. Estas duas bandas são típicas do MAA, como podemos ver na Figura 14. A menor intensidade relativa da banda a 1641 cm^{-1} do MAA (Figura 14) face à mesma presente a 1640 cm^{-1} nos MIPs (Figura 12), sugere que esta ligação participa na polimerização, o que de facto acontece [65], [89], [90]. A altura do pico, torna-se uma medida do grau da polimerização do MIP, quanto mais elevado for o pico, menor é o grau de polimerização. Assim, tendo em conta a intensidade desta banda no espectro dos MIPs (Figura 12) o grau de polimerização dos MIPs segue a ordem, $\text{MIP-3} > \text{MIP-1} > \text{MIP-2}$. A banda do MIP-4 encontra-se fundida com outro pico, o que torna mais difícil a sua comparação. Os espectros de FTIR-ATR de todos os MIPs (Figura 12) comprovam a inexistência da OTC. As bandas típicas da OTC, como a 1178 cm^{-1} correspondente ao OH do grupo fenólico ou a 1618 cm^{-1} correspondente ao C=C (aromático) no espectro da OTC (Figura 13) não estão presentes no espectro dos MIPs [91] Isto significa que a OTC não está presente, tendo os MIPs sido bem lavados.

Na Figura 15 encontram-se fotografias dos polímeros obtidos com as 4 receitas de MIP anteriormente referidas.



Figura 15 - Resultados das quatro sínteses de polímeros molecularmente impresso, após moagem e passagem por um peneiro de 200 μm .

Observa-se na Figura 15 que o MIP-1 e o MIP-4 apresentam uma tonalidade ligeiramente diferente da dos restantes MIPs bem como uma ligeira diferença na homogeneidade das partículas. A homogeneidade de partículas está diretamente relacionada com o tipo de polimerização. Tendo em conta o tipo de polimerização é de esperar que o MIP-1 e MIP-4, como são de polimerização em massa originem partículas pouco uniformes em tamanho e forma, enquanto os restantes resultem em partículas mais esféricas e uniformes, o que de facto acontece. Isto porque durante uma polimerização em massa, se forma uma massa compacta, que necessita ser fragmentado por moagem num almofariz para se obterem partículas individualizadas de menores dimensões. É o processo de moagem que é o responsável por criar as partículas, estando a forma e o tamanho destas diretamente relacionadas com este. A trituração do MIP neste tipo de polimerização tem também um papel importante na sensibilidade, uma vez que na trituração alguns locais de interação são destruídos, provocando um impacto negativo na capacidade de ligação dos MIPs a MM. Esta heterogeneidade entre partículas de MIP, de tamanho e forma faz com que se traduza em interações diferentes com a OTC. Para minimizar a diferença entre o tamanho das partículas, todos os MIPs foram passados pelo mesmo peneiro, garantindo assim que não havia partículas de tamanho superior a 200 μm . Salienta-se que neste processo, o MIP-2 e MIP-3, foram muito mais fáceis de peneirar, na medida em que, apenas uma pequena parte destes não passava pelo peneiro à primeira, facto que ainda se tornou mais evidente no MIP-3. Isto significa que, a maior parte das partículas destes MIPs apresenta um tamanho inferior a 200 μm . O oposto ocorreu no MIP-1, onde foi necessário repetir o processo de moagem várias vezes até todas as partículas deste apresentarem um tamanho inferior a 200 μm .

3.1.2 - Análise do revestimento do cristal de quartzo e a sua influência na resposta do sensor

O revestimento do sensor de massa, passa pela deposição de uma membrana polimérica de PVC, contendo o MIP, em cima do cristal. De acordo com a teoria, a forma como estão dispostos e a quantidade de elementos de reconhecimento presentes está diretamente relacionada com sensibilidade que o sensor irá apresentar. A sensibilidade diminui do centro para as bordas do

elétrodo, de acordo com uma curva gaussiana [92]. Assim, uma disposição da membrana mais centrada potência uma maior resposta, para igual área revestida. A deposição da membrana é um processo manual, que depende em muito do operador e exige muita prática. Tratando-se de uma suspensão, nem sempre uma maior quantidade de PVC se traduz numa maior quantidade de MIP, e importava perceber se o decréscimo da frequência devido ao revestimento poderia dar alguma indicação sobre a quantidade de MIP depositada sobre o cristal. Para tal realizou-se o estudo das frequências e dos parâmetros do circuito equivalente, apresentados na seção 1.5, em função da membrana e dos grãos de MIP depositados em cima do eletrodo. Os valores das frequências (f_s , f_p , f_{min} e f_{max}) e dos parâmetros do circuito equivalente (R e L) foram registados nas seguintes condições: 1) cristal limpo, 2) deposição de uma pequena camada da membrana de PVC/NPOE sem MIP, 3)-adição do MIP em 4 etapas, com a respetiva leitura de valores entre cada etapa, e por fim 4) a deposição de uma nova camada de membrana de PVC/NPOE sem MIP. As Figuras 16 e 17 apresentam os resultados obtidos para um cristal de 9 MHz, no qual se depositou o MIP-2, como elemento de reconhecimento.

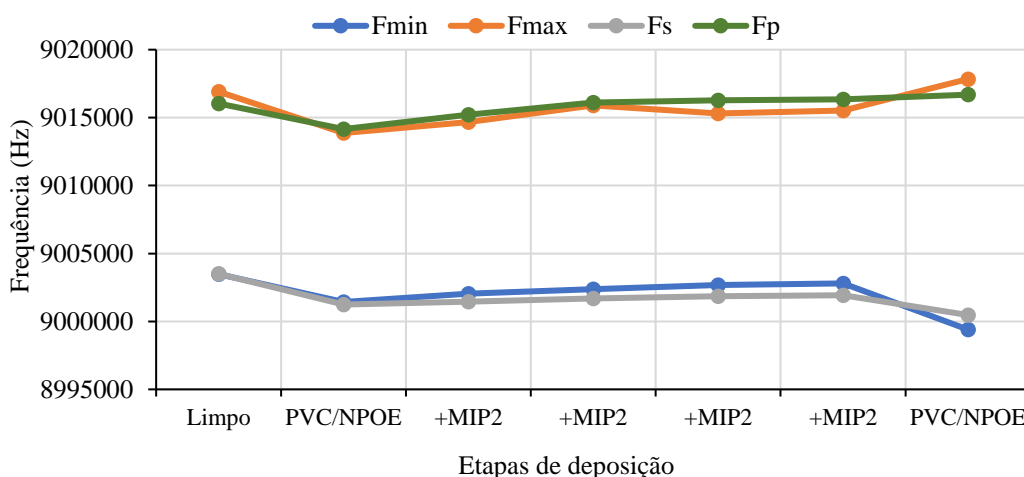


Figura 16 - Leitura da f_{min} (frequência à impedância mínima), da f_{max} (frequência à impedância máxima), da f_s (frequência de ressonância em série) e do f_p (frequência de ressonância em paralelo), aquando a deposição em cima do cristal uma membrana de PVC/NPOE sem MIP, MIP, seguindo-se uma nova camada de membrana de PVC/NPOE sem MIP.

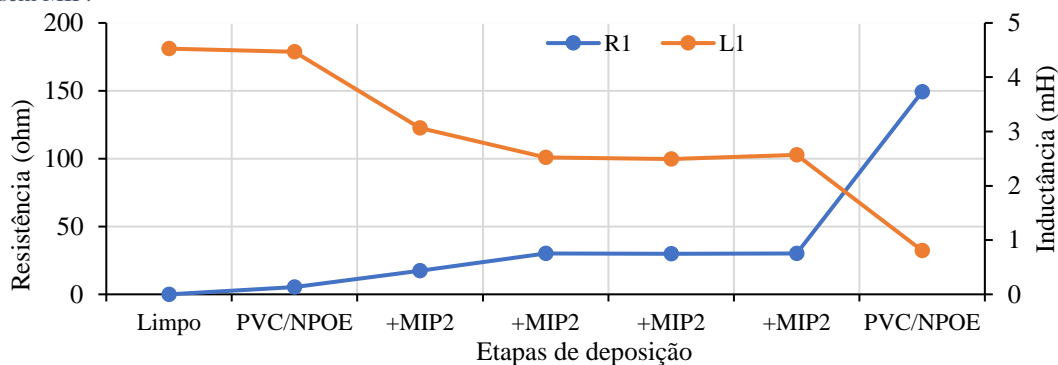


Figura 17 - Leitura da R_1 (resistência) e da L_1 (indutância) aquando a deposição em cima do cristal uma membrana de PVC/NPOE sem MIP, MIP, seguindo-se uma nova camada de membrana de PVC/NPOE sem MIP.

Podemos observar da Figura 16 que a frequência à impedância mínima (f_{min}) e a frequência em série (f_s) apresentam um comportamento semelhante. Tal como esperado, a deposição da membrana de PVC/NPOE (sem MIP) leva ao decréscimo acentuado das frequências, devido à massa depositada em cima do eletrodo. No entanto, a deposição do MIP nas várias etapas sucessivas, traduziu-se num aumento gradual de frequência. Este aumento das frequências na deposição do MIP pode ser explicado pela evaporação gradual do solvente (da membrana de PVC/NPOE) em cima do cristal, levando assim a crer que a presença do MIP não contribui para o aumento de massa em cima do cristal, logo não contribuindo para a variação de frequência. A deposição da última membrana de PVC/NPOE leva a novo decréscimo de frequência, tal como seria expectável. Isto porque a f_s está relacionada com a massa depositada no cristal, como podemos observar pela equação de *Sauerbrey* (equação 1), o mesmo acontece para a f_{min} .

Em relação aos parâmetros do circuito equivalente (Figuras 17) apenas R_1 e L_1 estão relacionados com as propriedades do revestimento colocado em cima do cristal. A resistência (R_1), toma o valor de zero com o cristal limpo e à medida que se coloca mais MIP esta vai subindo gradualmente até atingir um patamar, por fim quando se coloca nova membrana PVC/NPOE esta toma um valor muito superior, tal como seria esperado. Uma vez que, este parâmetro, está relacionado com a energia dissipada pelo sistema, quando se aumenta a quantidade de membrana em cima do cristal, aumenta-se também a energia dissipada.

A indutância, apresenta um comportamento oposto, esta diminui ligeiramente com a colocação da primeira camada de PVC/NPOE, e a medida que se vai colocando mais MIP esta desce gradualmente até atingir um patamar, por fim quando se coloca nova membrana de PVC/NPOE este valor toma um valor muito inferior, tal como seria esperado, Este parâmetro está relacionado com a massa depositada sobre o cristal, a medida que se coloca mais massa esta diminui.

Podemos então concluir deste estudo que a quantidade de MIP colocada como elemento de reconhecimento não tem um papel importante no decréscimo da frequência do sensor, pois o efeito da sua massa mal se faz sentir nas propriedades do circuito equivalente nem na frequência.

Com o intuito de tentar compreender até que ponto a quantidade de revestimento e a disposição deste em cima do cristal influenciava as respostas, traçou-se as várias curvas de calibração com as soluções de OTC para 3 cristais: A, B, C. Cada cristal foi limpo e sujeito à repetição do processo do revestimento e obtenção das respetivas curvas de calibração. Os cristais foram fotografados antes de cada utilização (Figura 18), recorrendo a uma camera hiperespectral (Specim Fx17.Filand) equipada com uma objetiva OLES macro f/4.0. Na Figura 19, encontra-se uma representação gráfica das zonas de linearidade das curvas e calibração da OTC em água Milli-Q, para os vários cristais em estudo.



Figura 18 - Fotos dos revestimentos A (ensaio 1 e 2), B (ensaio 1 e 2), C (ensaio 1 e 2). Os cristais apresentam o respetivo decréscimo na frequência em serie (ΔF).

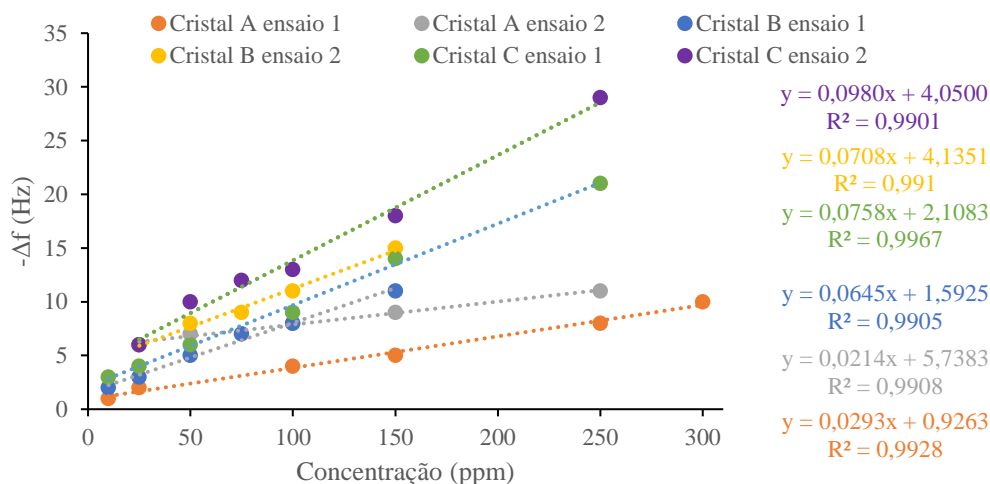


Figura 19 - Representação gráfica das zonas de linearidade das curvas de calibração da OTC em água Milli-Q, com um caudal entre 0,8-0,9 mL/min, para os revestimentos A (ensaio 1 e 2), B (ensaio 1 e 2), C (ensaio 1 e 2).

Analisando a Figura 18, podemos concluir que em todos os cristais é visível grandes quantidades de MIP, apesar de apresentarem um decréscimo de frequência (Δf) baixo, o que indica que grandes quantidades de revestimento não significam que estejam presentes grandes quantidades de elementos de reconhecimento, o que está de acordo com o concluído anteriormente.

Podemos observar na Figura 19 que os cristais apresentam sensibilidades muito baixas, facto que pode ser comprovado na Tabela 10. A zona de linearidade da curva de calibração dos cristais A e C é mais prolongada, enquanto que para o B é mais pequena. Isto poderá estar relacionado com o facto de o cristal A e C serem rugosos e o cristal B ser polido. O polimento do cristal poderá influenciar a zona de linearidade da curva de calibração na medida em que, a presença de rugosidades poderá aumentar a área de contacto da OTC com o cristal, o que se poderá traduzir numa zona de linearidade maior.

O cristal que apresenta maior sensibilidade é o C ensaio 2, seguindo pelo C ensaio 1, B ensaio 2, B ensaio 1, A ensaio 1 e por último o A ensaio 2, o que pode estar associado a uma elevada quantidade de revestimento no cristal. Mas este não é o único factor que influencia a sensibilidade.

Na Figura 18 estão presentes fotos dos cristais onde é visível a disposição de MIP dos vários revestimentos. O revestimento C ensaio 2 é o que apresenta a melhor curva de calibração, como é visível na Figura 19 e apresenta um revestimento mais uniforme e centrado. O revestimento B ensaio 2 é o terceiro com melhor curva de calibração e apresenta o revestimento menos uniforme, mas mais centrado no centro. O revestimento do cristal A ensaio 2, apresenta uma falha no centro do cristal, a menor sensibilidade entre todos e umas das respostas mais baixas. Podemos assim concluir que a sensibilidade não depende unicamente da quantidade de revestimento, a disposição deste nos cristais é um factor determinante. Esta deve ser centrada e uniforme para a obtenção de uma melhor curva de calibração e melhores sensibilidades.

Tabela 10 - Sensibilidade, ΔF e características dos revestimentos A (ensaio 1 e 2), B (ensaio 1 e 2) e C (ensaio 1 e 2).

Cristal	Sensibilidade	Revestimento	Δf (kHz)
Cristal A ensaio 1	0,0293	Uniforme, mas ligeiramente deslocado para a direita	-0,840
Cristal A ensaio 2	0,0214	Tem uma falha no centro	-1,325
Cristal B ensaio 1	0,0645	Ligeiramente deslocado para a direita e apresenta uma falha fora do centro	-1,658
Cristal B ensaio 2	0,0708	O menos uniforme, mas que apresenta uma maior quantidade no centro	-0,129
Cristal C ensaio 1	0,0758	Uniforme, mas ligeiramente deslocado para a esquerda	-1,321
Cristal C ensaio 2	0,0980	O mais uniforme	-2,735

Em suma, o tipo de polimento do cristal poderá influenciar a zona de linearidade, a variação da frequência do cristal com o revestimento não está diretamente relacionada com a quantidade de elementos de reconhecimento, e a sensibilidade depende não só da quantidade de elementos de reconhecimento, mas também da disposição destes em cima do cristal. Por conseguinte, pretende-se que o revestimento dos cristais seja o mais uniforme e centrado possível, independentemente da variação da frequência existente. Tendo em consideração as premissas anteriores, revestiram-se 4 cristais com uma membrana constituída por cada MIP em solução de PVC (30%) e NPOE (60 %) em THF. Na Figura 20 encontram-se fotos dos cristais revestidos com as diferentes membranas utilizados ao longo do trabalho.

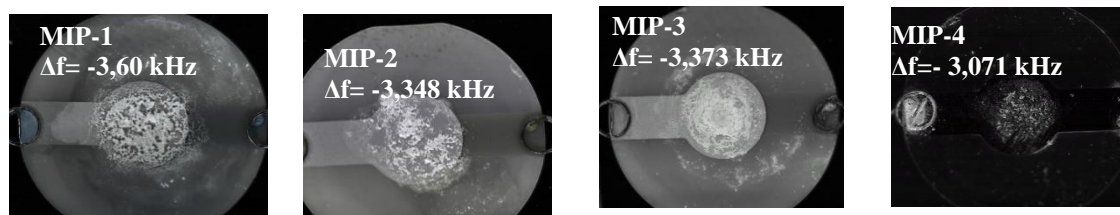


Figura 20 - Fotos dos cristais revestidos com uma membrana de MIP em solução de PVC (30%) e NPOE (60%), em THF. Os cristais apresentam o respetivo decréscimo na frequência (Δf).

Como se observa na Figura 20 para todos os cristais, a disposição do MIP em cima do eletrodo é centrada no centro do cristal, como era pretendido. Quanto à sua uniformidade, os cristais revestidos com o MIP-1 e MIP-2 não são tão uniformes como os revestidos com MIP-3 e MIP-4, o que se poderá traduzir em sensibilidades mais baixas. O estudo efetuado com cada um dos cristais encontra-se mais à frente.

Com o intuito de perceber se cristais revestidos com o mesmo MIP apresentavam a mesma sensibilidade, revestiu-se dois cristais para o MIP-1 e dois cristais para o MIP-2 e traçou-se as curvas de calibração da OTC em água Milli-Q, os resultados obtidos encontram-se na Figura. 21.

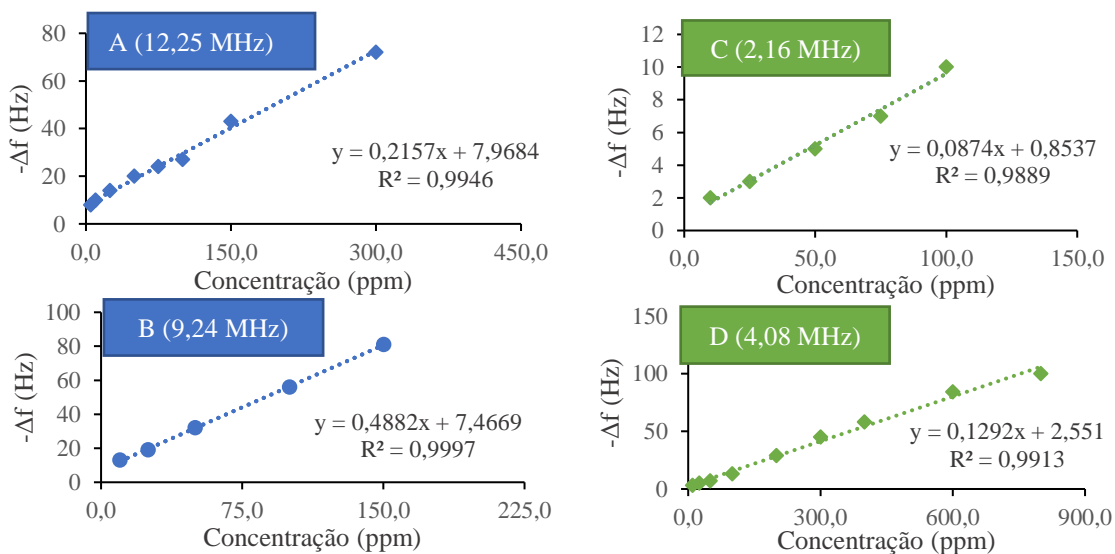


Figura 21 – Representação gráfica da zona linear das curvas de calibração da OTC em água Milli-Q, de 4 cristais, A e B revestidos com o MIP-1 e C e D revestidos com o MIP-2. Em cada gráfico indica-se o decréscimo de frequência devido ao revestimento.

Analisando a Figura 21, podemos concluir que tanto para o MIP-1 como para o MIP-2 diferentes revestimentos implicam diferentes sensibilidades. A sensibilidade de um cristal depende da quantidade de elementos de reconhecimento e disposição destes em cima do cristal.

3.1.3 - Estudo da influência do pH

Como referido no Capítulo 1 (Figuras 3 e 4), a OTC pode estar presente em solução em diferentes formas consoante o pH da solução. Com objetivo de avaliar se as diferentes formas poderiam influenciar a resposta do sensor à OTC, realizou-se um estudo de pH. Para tal, escolheu-se um dos MIPs que estavam a ser produzidos, o MIP-1, revestiu-se um cristal com o mesmo e injetaram-se soluções de 50,0 ppm de OTC cujo pH tinha sido acertado com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M, obtendo-se os dados apresentados na Figura 22.

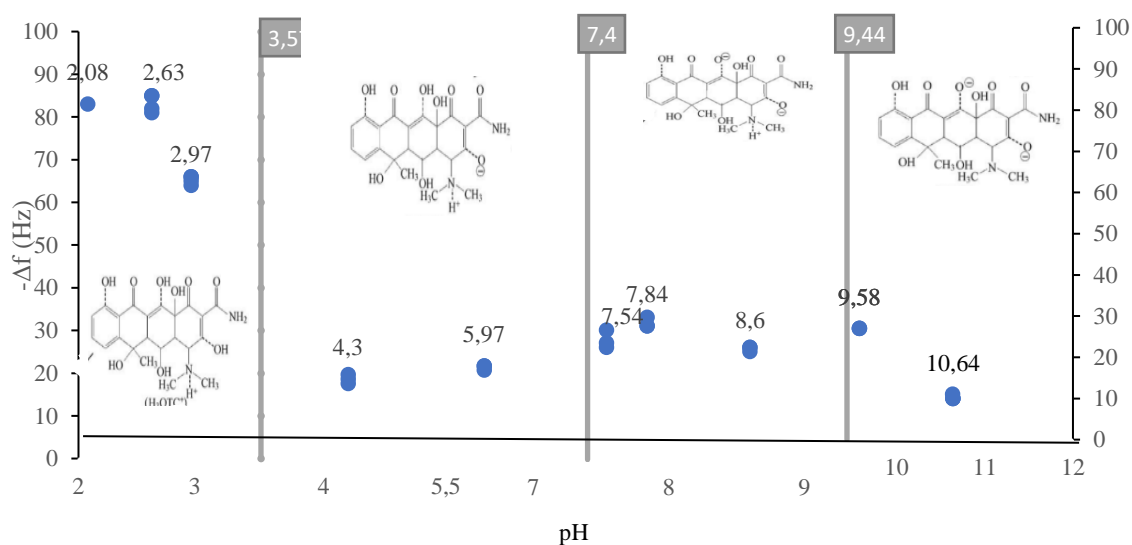


Figura 22 - Representação gráfica das respostas do sensor a uma solução de OTC de concentração de 50,0 ppm em função do pH da mesma.

Analisando a Figura 22 pode-se afirmar que o sensor apresenta as respostas maiores, ou seja, maior decréscimo de frequência, para pH inferiores a 2,63, quando a OTC se encontra exclusivamente sob a forma de catião. Para despistar possíveis contribuições do HCl, testaram-se várias soluções tampão com HCl para pH entre 2 e 3, e conclui-se que o sensor respondia às mesmas. Na Figura 23, apresenta-se uma resposta típica do sensor, à injeção no sistema de uma solução de OTC de 50,0 ppm, representando o decréscimo de frequência, seguida da recuperação da frequência para o valor da linha de base.

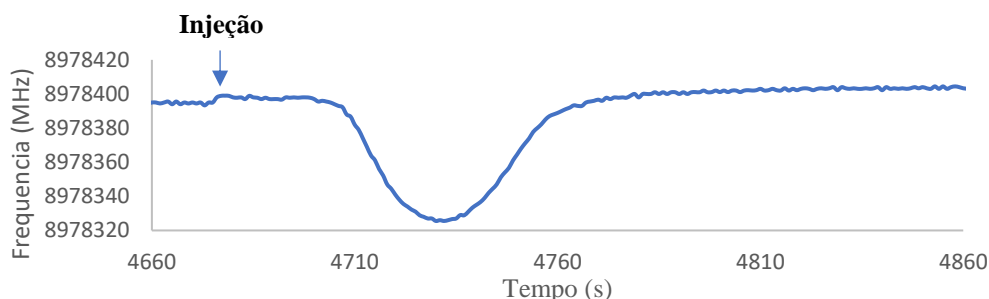


Figura 23 - Resposta típica de um cristal revestido com uma membrana com MIP-1 disperso na membrana de PVC (30%) e NPOE (60%) a uma injeção de uma solução de 50,0 ppm a um pH 2,63.

Mais tarde, percebeu-se que, como iremos ver mais à frente, o Cl^- é um interferente. Por este motivo, testou-se outra solução tampão para esta gama de pH, o tampão de citrato. Escolheu-se testar o tampão de citrato pois outros estudos para detetar a OTC recorrem a este tampão [65], tendo-se verificado que o sensor também respondia ao tampão de citrato. Não sendo possível usar qualquer tampão contendo HCl, nem tampão citrato, não foi possível concluir que o sensor daria respostas maiores para a forma catiónica da OTC.

Todavia, continua a existir a necessidade de manter a OTC na mesma forma iónica. Deste modo decidiu-se testar tampões, numa gama de valores de pH de 6,0-9,0, o pH das águas da aquicultura, mesmo correndo o risco de ocorrer hidrólise. Testou-se um novo tampão, o HEPES, a 0,001 M e pH 7,12. Na Tabela 11 encontram-se as respostas obtidas para este tampão

Tabela 11 - Resposta do sensor a uma solução tampão HEPES de concentração 0,001 M.

Linha de base do sistema	Solução injetada no sistema	$-\Delta f$ (Hz)
Água Milli-Q	Solução de tampão	11/11/10
Tampão	Solução de 10 ppm de OTC em tampão	8/8
	Solução de tampão	2/3

Analisando a Tabela 11, podemos verificar que o sensor praticamente não altera a sua frequência de vibração com a injeção de tampão HEPES quando o mesmo passa na linha de base do sistema. A pequena variação existente de 2/3 Hz que ocorre, será fruto da perturbação que se gera com abertura da válvula de injeção do sistema. De salientar também, que com a injeção de uma solução de OTC de baixa concentração (10 ppm) em tampão, o sensor respondeu duas vezes de modo igual (8 Hz), ou seja, a utilização deste tampão permite a deteção da OTC. Posto isto, o tampão HEPES foi o escolhido.

3.1.4 - Avaliação de possíveis interferentes

Com intuito de avaliar como o sensor revestido com os vários MIPs, respondia a outros compostos, fez-se uma análise de interferentes. Como interferentes escolheu-se outros antibióticos que poderiam estar presentes na água de aquicultura e seus semelhantes [1], apresentados na Figura 24 [32], bem como cloreto de magnésio e o cloreto de sódio. Escolheu-se o cloreto de magnésio uma

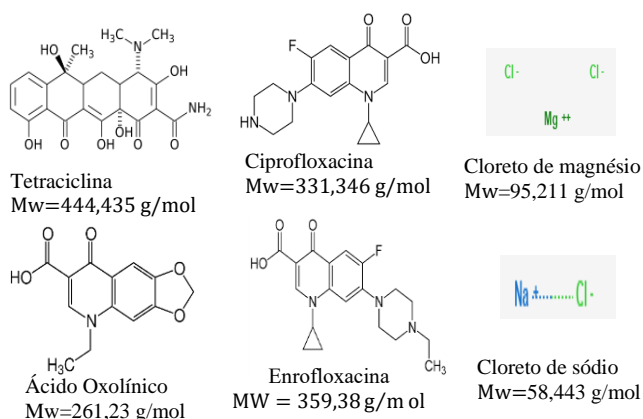


Figura 24 - Estrutura química da TC, CIP, ENR, AO, cloreto de sódio e do cloreto de magnésio.

vez que este ião é dos que mais interage com a OTC quando este se encontra em solução, como já vimos anteriormente, e o cloreto de sódio uma vez que, muitos dos antibióticos para se dissolverem em água necessitam da adição de HCl 0.01M, o que faz com que seja importante tentar perceber como o ião Cl⁻ poderá influenciar as respostas do sensor.

A avaliação dos interferentes foi feita pelo método das soluções separadas. A sensibilidade relativa em relação à OTC foi calculada dividindo a sensibilidade da OTC pela sensibilidade do interferente.

3.1.5 – Comportamento em água

Quatro cristais piezoelétricos de quartzo foram revestidos com uma membrana constituída por cada um dos MIPs individualmente em solução de PVC (30%) e NPOE (60%) em THF, que, depois de seca, produziu um decréscimo na frequência relativa ao revestimento de 3,606 kHz, 3,348 kHz, 3,373 kHz e 3,071 kHz, para o MIP-1, MIP-2 MIP-3 e MIP-4, respetivamente. Traçou-se a curva de calibração com as concentrações das soluções padrão da OTC em água Milli-Q e as variações da frequência (-Δf, Hz) observadas para cada um dos cristais. Na Figura 25, apresenta-se a zona linear de todas as curvas de calibração obtidas e na Tabela 12 a sensibilidade, a zona linear, o limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) para os cristais revestidos com o MIP-1, MIP-2, MIP-3 e MIP-4.

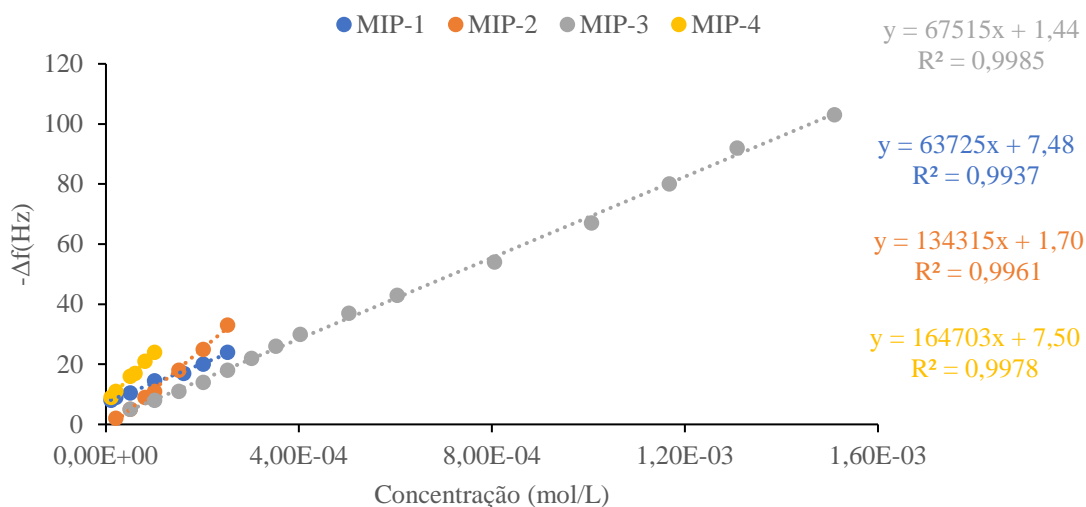


Figura 25 - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC em mol/L, e em água Milli-Q, com um caudal de 0,77 mL/min para o MIP-1, MIP-2, MIP-3 e de 0,80 mL/min para o MIP-4.

Tabela 12 - Sensibilidades, LOQ e LOD, para os cristais revestidos com o MIP-1, MIP-2, MIP-3 e MIP-4 em água Milli-Q.

MIP	Sensibilidade (Hz L mol ⁻¹)	Zona Linear (mol/L)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
MIP-1	63725	$1,01 \times 10^{-5} - 2,52 \times 10^{-4}$	5,45	9,81
MIP-2	134315	$2,012 \times 10^{-5} - 2,516 \times 10^{-4}$	8,52	28,4
MIP-3	67515	$5,03 \times 10^{-5} - 1,51 \times 10^{-3}$	206,3	687,6
MIP-4	164703	$1,01 \times 10^{-5} - 2,01 \times 10^{-4}$	2,73	9,11

Realizou-se a curva de calibração da OTC em água Milli-Q para os vários sensores com o intuito de perceber se os diferentes revestimentos reconheciam a OTC. Como observado na Figura 25, todos os sensores reconhecem a OTC com diferentes sensibilidades, que seguem a seguinte ordem, MIP-4, MIP-2, MIP-1 e MIP-3, sendo este último o menos sensível à OTC.

Para o MIP-1, traçaram-se igualmente as curvas de calibração de soluções padrão de possíveis interferentes, representando-se as variações da frequência (-Δf, Hz) observadas, para as diversas concentrações. Na Figura 26, apresenta-se a zona linear de todas as curvas de calibração e na Tabela 13 as sensibilidades, as sensibilidade relativas (divididas pela da OTC) e os limites de quantificação e deteção. Tratando-se de um sensor de massa, as unidades são apresentadas não só em mol, mas também em massa (mg/L, ou ppm).

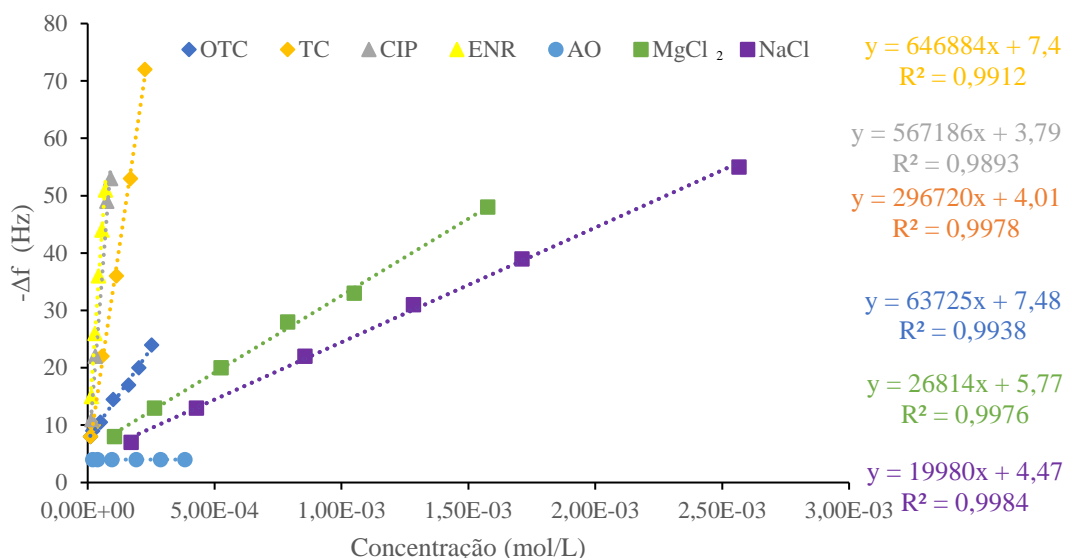


Figura 26 - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol/L, e em água Milli-Q, com um caudal de 0,76 mL/min. Cristal revestido com MIP-1.

Tabela 13 - Sensibilidades relativas, sensibilidades, LOQ e LOD, para a OTC, TC, CIP, ENR, AO, NaCl e MgCl₂, em água Milli-Q. Cristal revestido com MIP-1.

Composto	Sensibilidade Relativa ($\frac{Hz/ppm}{Hz/ppm}$)	Sensibilidade (Hz/ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Sensibilidade Relativa ($\frac{Hz L mol^{-1}}{Hz L mol^{-1}}$)	Sensibilidade ($Hz L mol^{-1}$)
OTC	1,00	0,1282	5,45	9,81	1,00	63725
TC	3,72	0,668	3,01	10,05	3,33	296720
CIP	9,47	1,698	3,83	12,77	6,36	567186
ENR	10,04	1,800	1,49	4,97	7,26	646884
AO	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0
NaCl	1,91	0,342	5,02	16,73	0,22	19980
MgCl ₂	1,57	0,282	4,21	14,03	0,30	26814

Analisando a Figura 26, podemos afirmar que o cristal revestido com o MIP-1 apresenta uma baixa sensibilidade para a OTC em água Milli-Q, quando comparado com a maioria dos antibióticos excetuando o ácido oxolínico, ao qual não responde. Ordenando as sensibilidades relativas em relação a OTC, vem:

$$\text{Sensibilidade relativa (em } \frac{Hz/ppm}{Hz/ppm} \text{): ENR} \approx \text{CIP} \gg \text{TC} \gg \text{NaCl} \approx \text{MgCl}_2 > \text{OTC} > \text{AO}$$

$$\text{Sensibilidade relativa (em } \frac{Hz L mol^{-1}}{Hz L mol^{-1}} \text{): ENR} > \text{CIP} \gg \text{TC} \gg \text{OTC} \gg \text{MgCl}_2 \approx \text{NaCl} > \text{AO}$$

A diferença das sensibilidades relativas em relação à OTC e à TC, bem como a diferença de respostas que é visível na Figura 26, poderá estar relacionada com a diferença estrutural existente entre os dois. A TC e a OTC são antibióticos da mesma família, a principal diferença entre estes antibióticos é a presença de um grupo OH na OTC. Esta desigualdade nas sensibilidades pode

sugerir que a presença deste grupo desfavorece a interação da OTC na cavidade do MIP. Quanto ao NaCl e ao MgCl₂ estes apresentam uma afinidade ao MIP semelhante, sendo a sensibilidade em relação à OTC ligeiramente superior para o NaCl. De forma a tentar perceber se o catião Na⁺ interferia na resposta do sensor à OTC, injetou-se no sistema uma solução de NaF de concentração 36,2 ppm, para a qual não se obteve qualquer resposta, o que significa que o sensor responde ao ião Cl⁻. A CIP, a ENR e a TC, devido à forma em que são comercializadas, necessitam de ser dissolvidas numa pequena quantidade de HCl 0,01 M para se tornarem solúveis em água, o que faz com que, por mais pequena que seja essa quantidade, haja uma interferência deste ião, que se traduz num aumento das respostas.

3.1.6 – Comportamento em tampão HEPES

Já tínhamos concluído anteriormente (secção 3.1.3) que era necessário trabalhar em condições de pH controladas, neste sentido, analisou-se o comportamento dos quatro cristais piezoelétricos de quartzo revestidos anteriormente. Para este estudo, o caudal de arraste do sistema FIA era tampão HEPES, em vez de água Milli-Q, usada nas experiências anteriores. Do ponto de vista prático, salienta-se que a estabilização dos sensores era por norma mais difícil e demorada. A estabilidade dos sensores revestidos com o MIP-1 e o MIP-4 na execução dos vários estudos foi mais fácil e estável de trabalhar em solução tampão que os restantes, apesar de o MIP-4, demorar um pouco a recuperar após uma resposta. Os cristais revestidos com o MIP-2 e MIP-3 foram os mais difíceis de trabalhar, houve uma dificuldade acrescida em estabilizar o sistema, que após uma resposta demorava bastante tempo a estabilizar na linha de base. Para todos os MIPs realizou-se a curva de calibração das soluções padrão de OTC preparadas em tampão HEPES com base na média de 4 réplicas, cujos desvios são sempre inferiores a 1 Hz e se encontram no anexo A.

Cristal piezoelétricos de quartzo revestido com o MIP-1

A Figura 27 apresenta a zona linear da curva de calibração das soluções padrão da OTC em tampão HEPES 0,001 M e a média de 4 medições das variações da frequência observadas ($-\Delta f$, Hz). Representaram-se na mesma figura as zonas lineares das curvas de calibração obtidas com soluções padrão dos possíveis interferentes e as respetivas variações da frequência ($-\Delta f$, Hz). A Tabela 14 apresenta as sensibilidades, as sensibilidade relativas e os limites de quantificação e deteção apresentadas na Figura 27.

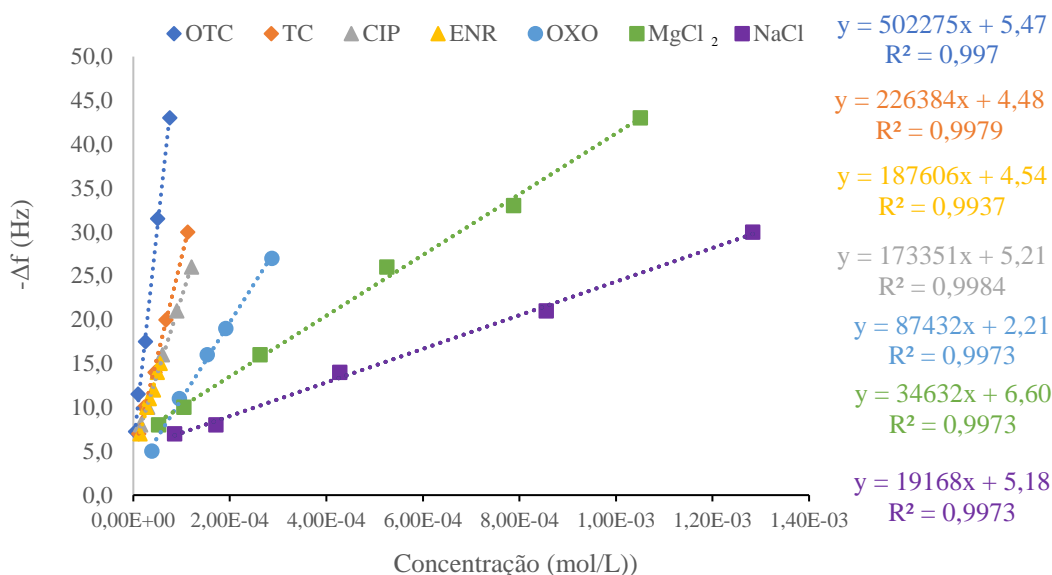


Figura 27 - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol/L, e em tampão HEPES de 0,001M, com um caudal de 0,73 mL/min. Cristal revestido com MIP-1.

Tabela 14 - Sensibilidades relativas, sensibilidades, LOQ e LOD, para a OTC, TC, CIP, ENR, AO, NaCl e MgCl₂, em tampão HEPES. Cristal revestido com MIP-1.

Composto	Sensibilidade			Sensibilidade		
	Relativa ($\frac{Hz/ppm}{Hz/ppm}$)	Sensibilidade (Hz/pm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Relativa ($\frac{Hz L mol^{-1}}{Hz L mol^{-1}}$)	Sensibilidade (Hz L mol ⁻¹)
OTC	1,00	0,5055	1,47	4,91	1,00	502275
TC	1,01	0,5094	2,60	8,66	0,45	226384
CIP	1,11	0,5622	1,13	3,78	0,35	173351
ENR	1,03	0,5220	1,58	5,28	0,37	187606
AO	0,66	0,3347	1,94	6,47	0,17	87432
NaCl	0,65	0,3280	2,30	7,67	0,04	19168
MgCl ₂	0,72	0,3637	3,31	11,03	0,07	34632

A Figura 27, mostra que a sensibilidade à OTC melhorou comparativamente ao mesmo estudo em água. Na verdade, as maiores respostas do sensor são agora para a OTC, comparativamente a todos os outros testados. A zona de calibração linear situa-se entre $5,03 \times 10^{-6} mol/L$ e $7,55 \times 10^{-5} mol/L$, apresenta uma sensibilidade para a OTC de $502275 Hz L mol^{-1}$, um LOD de $1,47 ppm$ e um LOQ de $4,91 ppm$.

Analisando a Figura 27, e os respetivos dados da Tabela 14, podemos ordenar as sensibilidades relativas em relação à OTC:

$$\text{Sensibilidade (em } \frac{Hz/ppm}{Hz/ppm} \text{): CIP} \approx \text{ENR} \approx \text{OTC} \approx \text{TC} > \text{MgCl}_2 \approx \text{AO} \approx \text{NaCl}$$

$$\text{Sensibilidade relativa (em } \frac{Hz L mol^{-1}}{Hz L mol^{-1}} \text{): OTC} > \text{TC} > \text{ENR} \approx \text{CIP} > \text{AO} > \text{MgCl}_2 \approx \text{NaCl}$$

A diferença entre as ordens de sensibilidades relativas em ppm e em mol, deve-se ao facto de o sensor responder à massa e apesar de responder ligeiramente menos por unidade de massa de

OTC ao de CIP, não se pode esquecer o facto da OTC ser a molécula mais pesada. A molécula de CIP e da ENR são muito semelhantes a nível de estrutura, o que pode explicar o facto do sensor as detetar com sensibilidades muito próximas. Por outro lado, o sensor deteta o AO com uma sensibilidade relativa muito baixa, o que está de acordo com o facto de a sua estrutura molecular ser muito diferente da MM, não “encaixando” tão bem nas cavidades do MIP.

No que se refere ao NaCl e ao MgCl₂, é de salientar a passagem para o tampão fez com que o sensor os detete agora com menor sensibilidade. Comparando estes dois sais, o sensor apresenta uma maior sensibilidade para o MgCl₂, o que pode estar ligado ao facto de existirem duas moles de iões Cl⁻ por cada mol de sal.

Cristal piezoelétricos de quartzo revestido com o MIP-2

Do mesmo modo que para o sensor anterior, traçou-se a curva de calibração com as concentrações das soluções padrão da OTC em tampão HEPES 0,001 M e a média de 4 medições das variações da frequência ($-\Delta f$, Hz) observadas, e as curvas de calibração com as concentrações de soluções padrão dos possíveis interferentes e as variações da frequência ($-\Delta f$, Hz) observadas, para o MIP-2. Na Figura 28, representa-se a zona linear de todas as curvas de calibração e a Tabela 15 apresenta-se as sensibilidades relativas, as sensibilidades e os limites de quantificação e deteção apresentadas na Figura 28.

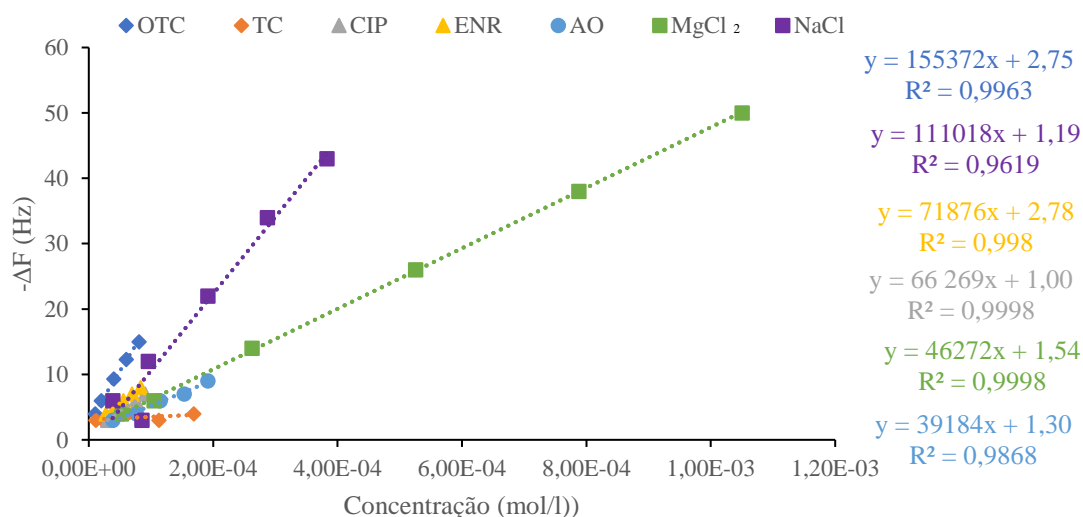


Figura 28 - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol/L, em tampão HEPES de 0,001M, com um caudal de 0,73 mL/min. Cristal revestido com MIP-2.

Tabela 15 - Sensibilidades relativas, sensibilidades, LOQ e LOD, para a OTC, TC, CIP, ENR, AO, NaCl e MgCl₂, em tampão HEPES. Cristal revestido com MIP-2.

Composto	Sensibilidade		LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Sensibilidade	
	Relativa $\left(\frac{Hz/ppm}{Hz/ppm}\right)$	(Hz/ppm)			de Relativa $\left(\frac{Hz L mol^{-1}}{Hz L mol^{-1}}\right)$	(Hz L mol ⁻¹)
OTC	1,00	0,313	1,32	4,40	1,00	155372
TC	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0
CIP	0,64	0,200	7,07	23,57	0,43	66269
ENR	0,64	0,200	11,30	37,66	0,46	71876
AO	0,48	0,150	3,65	12,17	0,25	39184
NaCl	1,35	0,422	2,46	8,19	0,71	111018
MgCl ₂	1,55	0,486	0,85	2,83	0,30	46272

Analisando a Figura 28, a zona linear da curva de calibração com as concentrações das soluções padrão da OTC em tampão HEPES 0,001 M situa-se a $1,01 \times 10^{-5} mol/L$ até aos $6,04 \times 10^{-5} mol/L$ apresenta uma sensibilidade para OTC de $155372 Hz L mol^{-1}$, um LOD de $1,32 ppm$ e um LOQ de $4,40 ppm$.

Analisando a Figura 28, e os respetivos dados da Tabela 15, podemos ordenar as sensibilidades relativas em relação à OTC:

Sensibilidade relativa (em $\frac{Hz/ppm}{Hz/ppm}$): MgCl₂ > NaCl > OTC > CIP = ENR > AO > TC

Sensibilidade relativa (em $\frac{Hz L mol^{-1}}{Hz L mol^{-1}}$): OTC > NaCl > ENR ≈ CIP > MgCl₂ ≈ AO > TC

Da Figura 28, e analisando a Tabela 15, pode-se afirmar que este sensor revestido com este MIP-2 apresenta uma baixa sensibilidade para o OTC, mas exibe um limite de deteção e de quantificação relativamente baixos, comparando com o MIP-1, apesar de se situar na zona dos ppm. Também se pode afirmar que dos 4 antibióticos, a OTC é a que apresenta maiores respostas. No que se refere à TC, molécula muito semelhante à OTC, este sensor não responde. A ausência de resposta para uma injeção de 1000 ppm de TC é uma surpresa e poderá ter origem na configuração da cavidade deste MIP. A OTC difere da TC pela presença de um grupo OH. A ausência deste grupo na TC poderá fazer com que este composto não seja capaz de interagir com as cavidades do MIP-2. Outra possível explicação prende-se com a utilização de um ALC diferente dos restantes MIPs. O ALC é o responsável por manter a morfologia, a estabilidade e a configuração espacial das cavidades do MIP. Desta forma, este comportamento poderá sugerir que este ALC não mantenha a configuração da cavidade na mesma medida que o outro ALC utilizado nas restantes sínteses.

Este revestimento apresenta uma grande sensibilidade para os sais, MgCl₂ e NaCl, principalmente para o NaCl, podendo a razão estar na interação com o ião Cl⁻. A sensibilidade aos sais deste MIP poderá estar relacionada com porosidade do mesmo. De acordo com a teoria pressupõe-se que este MIP apresente uma elevada porosidade, devido aos reagentes de partida e ao

método de polimerização, o que poderia facilitar a entrada dos sais, compostos estruturalmente pequenos, para o MIP.

Cristal piezoelétricos de quartzo revestido com o MIP-3

Tal como anteriormente, traçou-se a curva de calibração com as concentrações das soluções padrão da OTC em tampão HEPES 0,001 M e a média de 4 medições das variações da frequência ($-\Delta f$, Hz) observadas, e as curvas de calibração com as concentrações de soluções padrão de interferentes e as variações da frequência ($-\Delta f$, Hz) observadas, para o MIP-3. Na Figura 29, representa-se a zona linear de todas as curvas de calibração e na Tabela 16 apresenta-se as sensibilidades relativas, as sensibilidades e os limites de quantificação e deteção apresentadas na Figura 29.

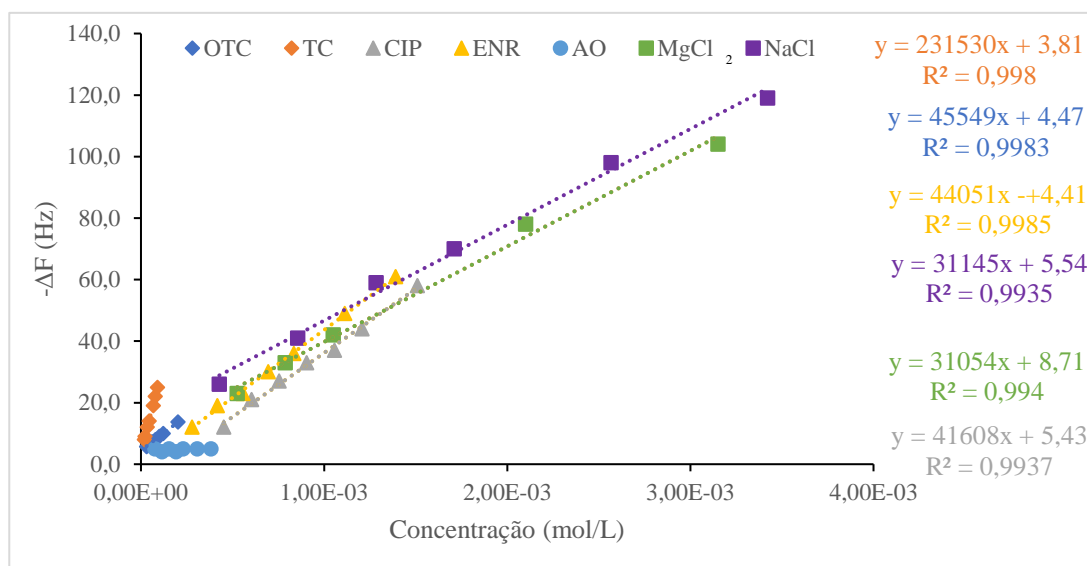


Figura 29 - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol/L, e em tampão HEPES 0,001M, com um caudal de 0,73 mL/min. Cristal revestido com MIP- 3.

Tabela 16- Sensibilidades relativas, sensibilidades, LOQ e LOD, para a OTC, TC, CIP, ENR, AO, NaCl e MgCl₂, em tampão HEPES. Cristal revestido com MIP-3.

Composto	Sensibilidade				Sensibilidade	
	Relativa ($\frac{Hz/ppm}{Hz/ppm}$)	Sensibilidade (Hz/ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Relativa ($\frac{Hz L mol^{-1}}{Hz L mol^{-1}}$)	Sensibilidade (Hz L mol ⁻¹)
OTC	1,00	0,0914	3,92	13,05	1,00	45549
TC	5,70	0,5210	0,31	1,04	5,08	231530
CIP	1,37	0,1256	75,40	251,34	0,91	41608
ENR	1,34	0,1223	71,68	23,895	0,97	44051
AO	0,00	0,0000	0,00	0,00	0,00	0
NaCl	5,83	0,5329	47,32	157,74	0,68	31145
MgCl ₂	3,57	0,3262	22,70	75,67	0,68	31054

A Figura 29, mostra a zona linear extraída das curvas de calibração obtidas. A zona de calibração linear da OTC em tampão, situa-se entre os $3,019 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ aos $3,012 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, apresenta uma sensibilidade para a OTC de $45549 \text{ Hz L mol}^{-1}$, um LOD de 3,92 ppm e um LOQ de 13,05 ppm. Analisando a Figura 29, e os respetivos dados da Tabela 16, podemos ordenar as sensibilidades relativas em relação a OTC:

Sensibilidade relativa (em $\frac{\text{Hz/ppm}}{\text{Hz/ppm}}$): TC \approx NaCl > MgCl₂ > CIP \approx ENR > OTC > AO

Sensibilidade relativa (em $\frac{\text{Hz L mol}^{-1}}{\text{Hz L mol}^{-1}}$): TC \gg OTC > ENR > CIP > NaCl \approx MgCl₂ > AO

A TC é a espécie à qual o sensor responde com maior sensibilidade. Este antibiótico é muito semelhante estruturalmente à OTC, a MM utilizada na síntese. Contudo não era de esperar que este antibiótico apresentasse uma sensibilidade muito superior a OTC, mas sim semelhante. Esta diferença poderá ter origem na configuração das cavidades deste MIP, que favorece a interação com a TC. A presença residual do ião Cl⁻ utilizado na dissolução da TC poderá contribuir para este efeito. É ainda de salientar que o sensor não é tão sensível a variações de massa na sua superfície para a OTC como para a TC. O sensor revestido com este MIP-3 não responde ao AO, o que não é uma surpresa, uma vez que é o antibiótico que apresenta uma estrutura mais distinta da OTC e dos restantes interferentes considerados.

Quanto aos sais, MgCl₂ e NaCl este revestimento também apresenta uma grande sensibilidade para estes compostos. A sensibilidade aos sais deste MIP, tal como para o anterior, poderá estar relacionada com porosidade do mesmo, que de acordo com a teoria pressupõe-se elevada. O que poderia facilitar a entrada e saída dos sais, compostos estruturalmente pequenos, para o MIP.

Cristal piezoelétricos de quartzo revestido com o MIP-4

Tal como anteriormente, traçou-se a curva de calibração com as concentrações das soluções padrão da OTC em tampão HEPES 0,001 M e a média de 4 medições das variações da frequência ($-\Delta f$, Hz) observadas e as curvas de calibração com as concentrações de soluções padrão dos interferentes e as variações da frequência ($-\Delta f$, Hz) observadas, para o MIP-4. Na Figura 30, representa-se a zona linear de todas as curvas de calibração e na Tabela 17 apresenta-se as sensibilidades relativas, as sensibilidades e os limites de quantificação e deteção apresentadas na Figura 30.

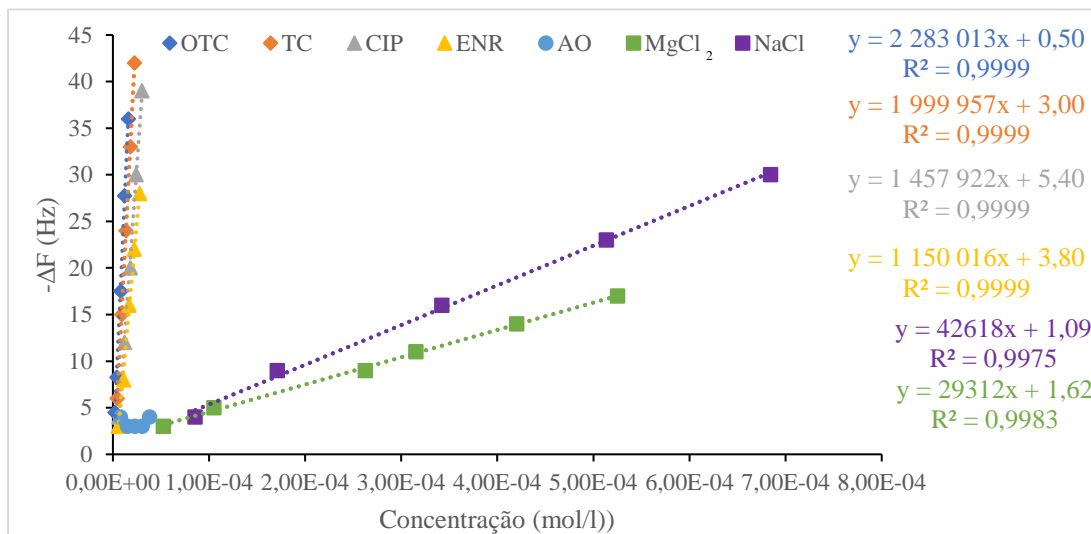


Figura 30 - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol/L, e em tampão HEPES de 0,001M, com um caudal de 0,80 mL/min. Cristal revestido com MIP-4.

Tabela 17 - Coeficientes de seletividade, sensibilidades, LOQ e LOD, para a OTC, TC, CIP, ENR, AO, NaCl e MgCl₂, em tampão HEPES. Cristal revestido com MIP-4.

Composto	Sensibilidade		LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Sensibilidade	
	Relativa $\left(\frac{\text{Hz/ppm}}{\text{Hz/ppm}}\right)$	(Hz/ppm)			Relativa $\left(\frac{\text{Hz L mol}^{-1}}{\text{Hz L mol}^{-1}}\right)$	Sensibilidade (Hz L mol ⁻¹)
OTC	1,00	4,738	0,50	1,66	1,00	2283013
TC	0,95	4,500	3,09	10,29	0,88	1999957
CIP	0,93	4,400	5,50	18,32	0,64	1457922
ENR	0,68	3,200	5,33	17,75	0,50	1150016
AO	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0
NaCl	0,15	0,729	1,44	4,79	0,02	42618
MgCl ₂	0,06	0,307	15,07	50,22	0,13	29312

A Figura 30, mostra as zonas lineares extraídas das curvas de calibração obtidas. A zona de calibração linear da OTC em tampão, situa-se entre os $2,01 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ e $2,012 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, apresenta uma sensibilidade para a OTC de $2283013 \text{ Hz L mol}^{-1}$ e um LOD de $0,50 \text{ ppm}$ e um LOQ de $1,66 \text{ ppm}$.

Analisando a Figura 30, e os respetivos dados da Tabela 17, podemos ordenar as sensibilidades relativas em relação a OTC:

Sensibilidade relativa (em $\frac{\text{Hz/ppm}}{\text{Hz/ppm}}$): OTC \approx TC \approx CIP $>$ ENR \gg NaCl $>$ MgCl₂ \approx AO

Sensibilidade relativa (em $\frac{\text{Hz L mol}^{-1}}{\text{Hz L mol}^{-1}}$): OTC $>$ TC $>$ CIP $>$ ENR \gg MgCl₂ \gg NaCl \approx AO

A OTC é a espécie à qual o sensor responde com maior sensibilidade. O sensor revestido com este MIP-4 não responde ao AO, o que mais uma vez não é surpresa, uma vez que é o antibiótico que apresenta uma estrutura mais distinta da OTC e dos restantes interferentes considerados. A sensibilidade do sensor ao NaCl e ao MgCl₂, é particularmente baixa, sendo de

realçar as respostas particularmente baixas obtidas com o sensor revestido com MIP-4 em comparação com os sensores com os revestimentos anteriores. Uma possível explicação será a inexistência de tantas zonas de interação na cavidade deste MIP disponíveis para interagir com os sais, outra explicação prender-se-á com o facto deste MIP-4 previsivelmente ser menos poroso. Isto devido aos reagentes de partida e seu volume e ao método de polimerização. É de salientar ainda que este sensor revestido com MIP-4, é o que apresenta limites de quantificação e limites de detecção mais baixos. Até ao momento este sensor é o único capaz de detetar soluções da OTC na ordem de 0,5 ppm.

3.1.7 – Comportamento em água vs. comportamento em tampão HEPES

Comparando as duas curvas de calibração em água Milli-Q e em tampão HEPES para os vários sensores é de salientar que a resposta dos sensores à OTC depende do pH, e à exceção do MIP-3, todos os sensores viram a sua sensibilidade à OTC aumentada com a mudança de água Milli-Q para o tampão HEPES. Isto significa que à exceção do MIP-3, que apresenta um comportamento distinto dos restantes, todos os MIPs interagem melhor com a OTC quando esta se encontra sobre a forma de neutra e/ou anião (pH=7.1). Todos os MIPs viram também os seus limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) melhorados, para valores muito inferiores aos encontrados em água Milli-Q.

Podemos ainda comparar o comportamento dos vários sensores, com as respostas que cada sensor apresenta com o mesmo ΔF , em tampão HEPES. Na Figura 31, estão representadas as respostas obtidas para cada cristal, revestido com os diferentes MIP num sistema FIA, aquando a injeção de uma solução de OTC com linha de base em tampão HEPES, para uma resposta com um $\Delta F \approx 18$ Hz.

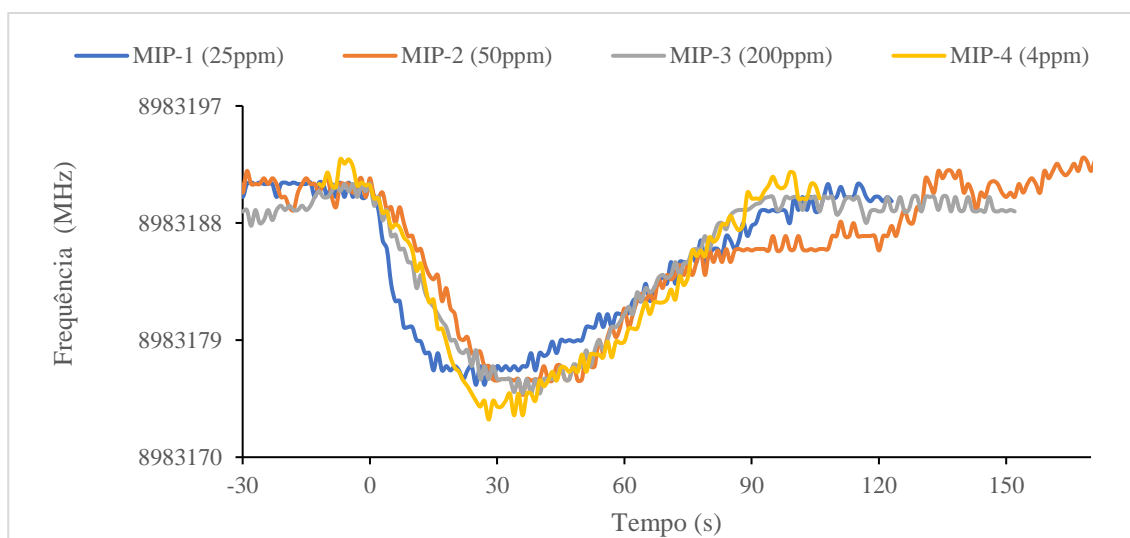


Figura 31 - Respostas obtidas para cristais revestidos com o MIP-1, MIP-2, MIP-3 e MIP-4, com a passagem de uma solução de OTC tampão de HEPES com um $\Delta F \approx 18$ Hz.

Analisando a Figura 31, observa-se que o MIP-1 foi o que apresentou uma resposta mais rápida, em relação aos restantes, o que poderá estar relacionado com a porosidade do MIP. A porosidade do MIP, está relacionado com o solvente, pois este é o responsável por misturar os componentes envolvidos na polimerização numa única fase e produzir poros que assegurem boas propriedades de fluxo nos MIPs. Quando um MIP apresenta boas propriedades de fluxo espera-se que este efeito se torne visível na velocidade a que a resposta ocorre. Por este motivo poder-se-ia concluir que o MIP-1 apresenta muitos poros e boas propriedades de fluxo. No entanto pela teoria sabe-se também que estas boas propriedades de fluxos são conseguidas, com volumes grandes de solventes que se traduzem num aumento do volume dos poros do polímero. Tendo em conta que o volume de solvente utilizado na síntese dos MIPs segue a ordem: MIP-2 > MIP-3 > MIP-4 > MIP-1, o MIP-1 seria o que apresentaria menos poros. De forma análoga se poderia concluir pelo tipo de polimerização. À partida, uma vez que o MIP-1 e MIP-4 são do tipo polimerização em massa, esperar-se-ia que estes apresentassem poros mais pequenos comparativamente aos restantes, visto que uma polimerização deste tipo requer uma menor quantidade de solvente. O MIP-2 é o que apresenta as segundas respostas mais rápidas, o que está de acordo com a teoria, pois este é o que recorre na sua síntese a um volume de solvente maior. Nos MIPs obtidos por polimerização por precipitação, formam-se partículas precipitadas num solvente, e espera-se que as mesmas apresentem uma maior porosidade do que o resultado da polimerização em massa. Comparando o MIP-2 e o MIP-3, que são de polimerização por precipitação, prevê-se que o MIP-2 apresente a maior porosidade, pois, na síntese do MIP-2 utiliza-se uma maior quantidade de solvente do que na síntese do MIP-3, o que está de acordo com os resultados obtidos

3.1.8 - Qual o melhor MIP?

A escolha do melhor MIP tem de ter em conta vários fatores, como a sensibilidade deste a OTC, a sua seletividade, a rapidez da resposta e da recuperação, bem como os seus limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ). Pretende-se que o MIP escolhido apresente uma boa sensibilidade para a OTC, seja bastante seletivo para esta, seja fácil de trabalhar, e apresente LOD e LOQ baixos o suficiente para permitir detetar a OTC nas águas da aquicultura. Posto isto, nesta parte do trabalho, efetuou-se uma comparação dos 4 MIPs sintetizados, considerando que a sensibilidade absoluta dos sensores, depende previsivelmente da quantidade e distribuição do MIP no cristal. Ou seja, esta análise é efetuada considerando as condições experimentais do trabalho.

Antes de analisar os parâmetros descritos em cima é necessário salientar que, de forma geral, todos os MIPs reconheciam a OTC e os sensores que os incorporam respondem reversivelmente à mesma. À exceção do sensor revestido com o MIP-3, que mostra uma preferência pela TC, todos os outros sensores mostram preferência pela OTC relativamente aos antibióticos e sais testados.

A Tabela 18 mostra um resumo da sensibilidade, limites de detecção e quantificação e limites de linearidade para os sensores revestidos com os vários MIPs. Apesar destes parâmetros variarem com o modo de revestir o cristal e por isso não permitirem que se comparem os diferentes MIPs, eles são apresentados porque permitem concluir sobre a aplicabilidade dos sensores consoante os valores presentes nas águas da aquicultura.

Tabela 18 - Tabela síntese de algumas das propriedades dos MIPs utilizados neste trabalho.

MIP	MIP-1	MIP- 2	MIP- 3	MIP- 4
Sensibilidade (Hz/ppm)	0,5058	0,313	0,0914	4,738
Sensibilidade (Hz L mol⁻¹)	502275	155372	45549	2283013
LOD (ppm)	1,47	1,32	3,92	0,50
LOQ (ppm)	4,91	4,40	13,05	1,66
Zona Linear (ppm)	5 – 75	5 – 50	15-100	1 – 10

Analisando a Tabela 18 nas condições experimentais do trabalho, podemos concluir que as sensibilidades seguem a ordem; MIP-4>MIP-1>MIP-2>MIP-3. A sensibilidade está relacionada com o agente reticulante na síntese do MIP. Com base na Tabela 9 sabe-se que apenas o MIP-2 recorre a um agente reticulante diferente, o TRIM. Sendo o agente reticulante o responsável por manter a cavidade com uma estrutura tridimensional, com a forma e a funcionalidade complementar a MM após a remoção da mesma, permitindo uma boa capacidade de ligação à MM, esperar-se-ia que este MIP apresentasse uma sensibilidade diferente dos restantes, ao contrário do que acontece. Para além do tipo de agente reticulante, a %ALC (mol), também irá influenciar configuração da cavidade do MIP e por conseguinte a sensibilidade. A %ALC (mol) varia consoante a receita de síntese do MIP e segue a ordem MIP-3>MIP-1>MIP-4>MIP-2. Esta percentagem deve tomar um valor suficientemente elevado para manter a estabilidade e os locais de reconhecimento intactos, mas não demasiado elevado pois poderá resultar numa diminuição do MF por unidade de massa. Tendo isto em consideração espera-se que o MIP-3 que apresenta a %ALC (mol) mais elevada apresente uma diminuição do MF por unidade de massa e por conseguinte a menor sensibilidade de todos, o que está de acordo com os resultados obtidos. O MIP-2 em contrapartida como apresenta a %ALC (mol) mais baixa, espera-se uma menor estabilidade dos locais de ligação, que se traduziria numa menor sensibilidade, o que não ocorre.

Se sensibilidade absoluta de um sensor, pode ser otimizada pois depende previsivelmente da quantidade e distribuição do MIP no cristal, é importante analisar a seletividade. Na Figura 32, estão representadas as várias seletividades relativas em relação à OTC calculadas para os vários MIPs estudados. Analisando a Figura 32 podemos concluir que os MIP-1 e o MIP-2 são os que apresenta as seletividades relativas em relação à OTC dos interferentes, mais afastadas, o que torna

estes MIPs os mais seletivos para a OTC, uma das principais características pretendidas para a escolha do melhor MIP. A seletividade do MIPs segue a ordem MIP 1>MIP-2>MIP-4>MIP-3 e está normalmente relacionada com a polaridade do solvente na síntese do MIP. A polaridade dos solventes utilizados na síntese da polimerização (Tabela 9) segue a ordem: MIP-1>MIP-4≈MIP-2≈MIP-3, sendo o MIP-1 aquele que apresenta uma polaridade maior e mais distinta. Da teoria sabe-se que para uma abordagem não covalente a polaridade do mesmo tem de promover a formação do complexo MF-MM, aumentando o número de locais de ligação no MIP e inibindo a possibilidade de se formarem ligações não específicas. Solventes menos polares aumentam a formação do complexo MF-MM, facilitando a interação polar não covalente, e reduzem a formação de dímeros. A presença de dímeros vai diminuir a possibilidade de ligações não específicas à MM, aumentando a seletividade do MIP. Como referido anteriormente, o MIP 1 é o que apresenta a polaridade mais elevada e por este motivo seria de esperar uma maior dificuldade na formação do complexo MF-MM e uma menor formação de dímeros que iram contribuir para as ligações não específicas, o que se traduziria numa diminuição da seletividade, comparativamente aos outros MIPs, oposto ao que acontece. Uma possível explicação é o reduzidíssimo volume que este MIP utiliza para a sua síntese, fazendo com que estes factos vejam a sua importância reduzida. Outra possibilidade reside nas constantes da velocidade de formação de complexo MF-MM e de dímeros, estas poderão ser suficientemente elevadas ao ponto de inibir a formação de ligações não específicas. O excesso de MF a que este MIP recorre poderá contribuir para o acontecimento.

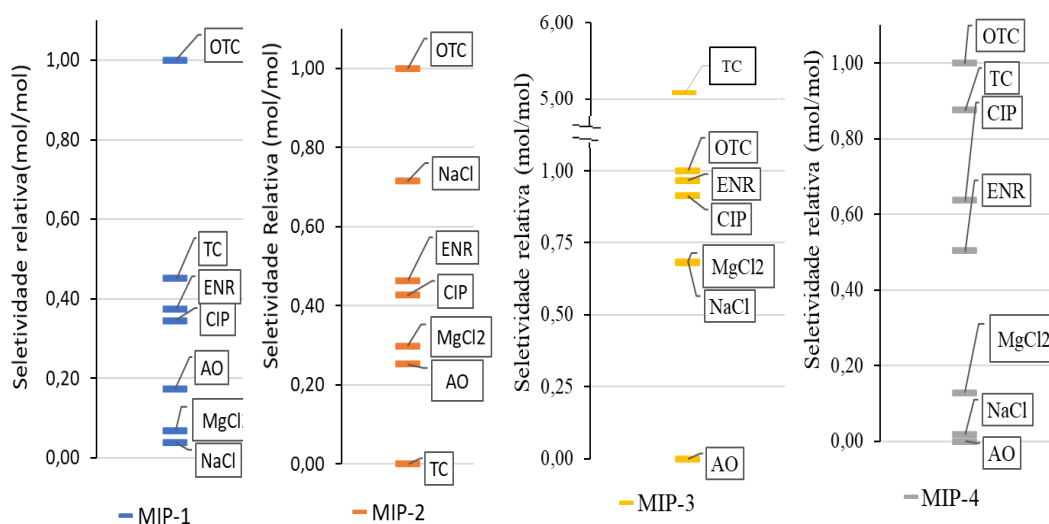


Figura 32 - Representação gráfica das seletividades relativas em relação à OTC, desta e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em mol, para os vários MIPs sintetizados neste trabalho.

Outras características dos sensores são necessárias ter em conta para a escolha do sensor para uma determinada aplicação como o LOD e o LOQ que segue a ordem; MIP-4<MIP-2<MIP-

MIP-3. Pretende-se que estes limites sejam baixos o suficiente para conseguir detetar a OTC com um nível aceitável de precisão nas águas da aquicultura. Como referido anteriormente tendo em conta as doses administradas, e uma densidade de produção de 25 kg/m³, estima-se que nas águas da aquicultura existam entre 1,88 mg/L – 6,25 mg/L de OTC. Os MIP-1, MIP-2 e MIP-4 apresentam LOD inferiores a 1,88 mg/L relativamente baixos sendo perfeitamente capazes de detetar a OTC nas águas da aquicultura. O MIP-3 em contrapartida apresenta LOD e LOQ mais elevados não tão indicados para a deteção de OTC nos valores pretendidos.

Em suma, nas condições experimentais do trabalho, o MIP-4 foi o que apresentou a maior sensibilidade para a OTC. No entanto, uma vez que a sensibilidade absoluta de um sensor, pode ser otimizada pois depende previsivelmente da quantidade e distribuição do MIP no cristal, conclui-se que a seletividade é a característica mais importante, e desta forma, a escolha recai sobre o MIP-1, o mais seletivo. Este MIP, apresenta uma boa sensibilidade e LOD e LOQ baixos o suficiente para a deteção da OTC nas águas de aquicultura. Salienta-se também que o MIP-2 apresenta uma seletividade semelhante à do MIP-1, no entanto este não poderia ser utilizado em águas de estuário, águas com elevada concentração do íon Cl^- .

É importante ainda salientar que todos os sensores privilegiam a entrada de moléculas com maior massa, tal como podemos observar pela comparação dos gráficos das curvas de calibração para todos os MIPs em mol, com os mesmos em mg/L apresentados no Anexo B. O que tendo em conta que todo o trabalho foi efetuado com base em sensores de massa é uma vantagem.

4 - Conclusões gerais

A detecção da OTC nas águas da aquicultura é importante, pois permite que a sua quantidade seja alvo de monitorização ao longo do tempo, evitando que permaneça nas mesmas causando resistência bacteriana, ou que vá para o meio ambiente ainda como agente ativo.

Com este trabalho, pretendeu-se analisar qual o melhor MIP como elemento de reconhecimento da QCM para detetar este antibiótico em águas de aquicultura. Como tal seguiram-se 4 receitas de MIPs já existentes na literatura e avaliou-se a sua performance como elemento de reconhecimento na QCM.

Todos os MIPS foram analisados por FTIR-ATR concluindo-se que todos os MIPS foram bem lavados, pois não apresentaram nenhuma banda típica da OTC nos seus espectros. Todos os MIPS apresentaram espectros semelhantes levando a crer que todas as partículas dos MIPS tinham disponíveis para ligações os mesmos grupos funcionais.

Para avaliar o comportamento dos MIPs, os cristais depois de revestidos e secos foram usados como sensores de massa num sistema de injeção em fluxo (FIA). Traçou-se as curvas de calibração da OTC em água Milli-Q e em tampão HEPES, para a OTC e para os interferentes. De forma geral, todos os MIPs reconheciam a OTC e os sensores que os incorporam responderam reversivelmente à mesma. A maioria dos sensores viram a sua sensibilidade à OTC aumentada com a mudança de água Milli-Q para o tampão HEPES e à exceção do sensor revestido com o MIP-3, que mostra uma preferência pela TC, todos os outros sensores mostram preferência pela OTC relativamente aos antibióticos e sais testados. O MIP-1 e o MIP-2 exibem uma preferência acentuada à OTC face aos restantes antibióticos. Apesar o MIP-2 ter apresentado uma seletividade semelhante ao anterior, não se aconselha o seu uso para águas de estuário devido as suas elevadas respostas ao NaCl. Posto isto, o MIP-1 foi o escolhido, como o mais adequado para o propósito do trabalho.

Podemos concluir que, neste trabalho, o sensor revestido com o MIP-1 apresenta-se como o melhor sensor para a OTC, com respostas e recuperação rápidas e um grande intervalo de linearidade. Comparando os resultados obtidos com o sensor ótico já existente para a detecção da OTC, o sensor com o MIP-1 apresenta um LOD de 1,47ppm e uma sensibilidade de 0,505 Hz/ppm, que apesar de serem valores superiores aos do sensor ótico já publicado, podem ainda ser melhorados com uma otimização da deposição da membrana de reconhecimento.

A disposição e a quantidade do elemento de reconhecimento em cima do cristal de quartzo deve ser o mais elevada, centrada e uniforme possível. Neste trabalho não se conseguiu avaliar a quantidade depositada através dos parâmetros elétricos e o processo de aplicação do revestimento não foi reprodutível. Conclui-se que a maior dificuldade do trabalho estará em melhorar o modo de

depositar o revestimento em cima do sensor, embora o LOD de 1,47 ppm do sensor com o MIP-1 permita a sua utilização nas águas da aquicultura como pretendido.

Bibliografia

- [1] P. Taylor, A. M. P. T. Pereira, L. J. G. Silva, L. M. Meisel, and A. Pena, “Fluoroquinolones and tetracycline antibiotics in a portuguese aquaculture system and aquatic surroundings: occurrence and environmental impact,” *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, no 78, pp. 959–975, 2015.
- [2] A. Sapkota et al., “Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities,” *Journal of Environment International.*, vol. 34, no. 8, pp. 1215–1226, 2008.
- [3] “Estatísticas da pesca 2018.”, Lisboa Portugal, Instituto Nacional de Estatística, I.P, 2019, ISBN 978-989-25-0489-6.
- [4] F. C. Cabello et al., “Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health,” *Environmental Microbiology*, vol. 15, no. 7, pp. 1917–1942, 2013.
- [5] “Facts, figures and farming, aquaculture”, Comissão Europeia, Disponível em: https://ec.europa.eu/fisheries/cfp/aquaculture/facts_pt. (acedido em 05/02/2021)
- [6] J. Rosa et al., “Uptake of enrofloxacin from seawater to the macroalgae *Ulva* and its use in IMTA systems,” *Aquaculture*, vol. 516, 2020.
- [7] E. M. Agency, “Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017,” 2017.
- [8] “Solo e biodiversidade. Produção em aquicultura,” Portal do Estado do ambiente (31 de maio de 2019). Disponível em: <https://rea.apambiente.pt/content/produção-em-aquicultura>. (acedido em 05/02/2021).
- [9] L. J. Schmidt, M. P. Gaikowski, W. H. Gingerich, V. K. Dawson, and T. M. Schreier, “An Environmental Assessment of the Proposed Use of Oxytetracycline-Medicated Feed in Freshwater Aquaculture,” vol. 54603, no. 608, pp. 1–136, 2007.
- [10] J. F. Leal, E. B. H. Santos, and V. I. Esteves, “Oxytetracycline in intensive aquaculture: water quality during and after its administration, environmental fate, toxicity and bacterial resistance,” *Aquaculture*, vol. 11, no. 4, pp. 1176–1194, 2019.
- [11] U. Szymańska, M. Wiergowski, I. Sołtyszewski, J. Kuzemko, G. Wiergowska, and M. K. Woźniak, “Presence of antibiotics in the aquatic environment in Europe and their analytical monitoring: Recent trends and perspectives,” *Microchemical Journal.*, vol. 147, pp. 729–740, 2019.
- [12] Ecdc, Efsa, and Ema, “ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals1,” 2015.
- [13] “Programa Nacional de Prevenção, Controlo de infeção e Resistência aos Antimicrobianos. “Antibióticos: use-os com cuidado!”, Direção geral da Saúde. [novembro de 2017] Disponível em: <https://www.dgs.pt/programa-nacional-de-controlo-da-infeccao/ficheiros-de-upload/dea2017-5-perguntas-pdf.aspx>. (acedido em 05/02/2021)
- [14] S. M. Armstrong, B. T. Hargrave, and K. Haya, “Antibiotic use in finfish aquaculture: Modes of action, environmental fate, and microbial resistance,” *Environment. Chemistry.*, vol. 5, pp. 341–357,

- 2005.
- [15] “Antibacterianos na Piscicultura: Erros, Acertos e Riscos – Parte 1,”.Panorama da Aquicultura.Vol 162 (2017). Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/antibacterianos-na-piscicultura-erros-acertos-e-riscos/>. ISSN 1519-1141(acedido em 05/02/2021)
- [16] “Antimicrobianos- bases teóricas e uso clínico,” Anvisa, (2007). Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/sulfonamidas2.htm. (acedido em 05/02/2021)
- [17] J. Romero, C. Gloria, and P. Navarrete, “Antibiotics in aquaculture – use, abuse and alternatives,” Health and Environment in Aquaculture, Dr. Edmir Carvalho (Ed.), ISBN: 978-953-51-0497-1, In Tech. pp. 159–198.
- [18] V. Kumar and S. Roy, “Aquaculture drugs: sources, active ingredients, pharmaceutic preparations and methods of administration,”Aquaculture, vol. 08, no. 09, 2017.
- [19] Antibióticos na aquicultura,” .Panorama da aquicultura. Vol 105.(2018) Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/sanidade-aquicola-antibioticos-na-aquicultura>. ISSN 1519-1141. (acedido em 05/02/2021)
- [20] S. Sekkin and C. Kum, Antibacterial Drugs in Fish Farms: Application and Its Effects, Recent Advances in Fish Farms, Dr. Faruk Aral (Ed.), ISBN: 978-953-307-759-8, InTech, 2011.
- [21] “Heads of Medicines Agencies.” HMA, Disponível em: <https://www.hma.eu/>.(acedido em 05/02/2021)
- [22] “Medicamentos veterinários destinados a peixes 2019.”, HMA Disponível em: https://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Veterinary_medicines/CMDv_Website/Procedural_guidance/Miscellaneous/Veterinary_Medicinal_Products_intended_for_fish_2019.xlsx. (acedido em 05/02/2021)
- [23] “FishMedPlus,” EUCPN, (2019) Disponível em: <https://www.fve.org/cms/wp-content/uploads/FishMedPlus-Newsletter-February-2019.pdf> (acedido em 05/02/2021)
- [24] M. Seifrtová, L. Nováková, C. Lino, A. Pena, and P. Solich, “An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters,” Analytic Chimica Acta, vol. 649, no. 2, pp. 158–179, 2009.
- [25] S. Mansano, “Avaliação da toxicidade aguda do antibiótico ciprofloxacina aos cladóceros daphnia magna e ceriodaphnia silvestri,” Fórum Ambiental., vol. 8, pp. 76–88, 2012.
- [26] K. Kümmerer, “Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I,”Journal of Chemosphere, vol. 75, no. 4, pp. 417–434, 2009.
- [27] M. E. Roca Jalil, M. Baschini, and K. Sapag, “Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite,” Applied Clay Science, vol. 114, pp. 69–76, 2015.
- [28] K. Kummerer, “Significance of antibiotics in the environment.,” Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 52, no. 1, pp. 5–7, 2003.
- [29] J. Shaojun, Z. Shourong, Y. I. N. Daqiang, W. Lianhong, and C. Liangyan, “Aqueous oxytetracycline degradation and the toxicity change of degradation compounds in photoirradiation process,” Journal

- of Environmental Sciences., vol. 20, pp. 806–813, 2008.
- [30] N. Kemper, “Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment,” *Ecological Indicators.*, vol. 8, pp. 1–13, 2008.
- [31] A. Almeida, S. Duarte, R. Nunes, H. Rocha, A. Pena, and L. Meisel, “Human and Veterinary Antibiotics Used in Portugal—A Ranking for Ecosurveillance,” *Toxics*, vol. 2, no. 1, pp. 188–225, 2014.
- [32] “Hidroclorato de Oxitetraciclina,” Pubchem- Biblioteca Nacional de Medicina Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxytetracycline#section=Names-and-Identifiers>. (acedido em 05/02/2021)
- [33] C. Zhao et al., “Role of pH on photolytic and photocatalytic degradation of antibiotic oxytetracycline in aqueous solution under visible/solar light: Kinetics and mechanism studies Chun,” *Applied Catalysis B Environmental.*, vol. 134–135, pp. 83–92, 2013.
- [34] S. Gastalho, G. J. Silva, and F. Ramos, “Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana : Impacto em saúde pública Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance : Health care impact,” *Acta Farmacêutica Portuguesa.*, vol. 3, n. 1, pp. 29–45, 2014.
- [35] J. F. Leal, V. I. Esteves, and E. B. H. Santos, “Use of sunlight to degrade oxytetracycline in marine aquaculture’s waters,” *Environmental Pollution.*, vol. 213, pp. 932–939, 2016.
- [36] M. L. Nelson and S. B. Levy, “The history of the tetracyclines,” *Annals of the New York Academy of Sciences.*, vol. 1241, no. 1, pp. 17–32, 2011.
- [37] “Oxytetracycline hydrochloride,” *Chemical Book*, (2017) Disponível em: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9311671.htm. (acedido em 05/02/2021)
- [38] R. Daghrir and P. Drogui, “Tetracycline antibiotics in the environment: a review,” *Environment Chemistry.*, vol. 11, no. 3, pp. 209–227, 2013.
- [39] C. Zhao *et al.*, “Role of pH on photolytic and photocatalytic degradation of antibiotic oxytetracycline in aqueous solution under visible/solar light: Kinetics and mechanism studies Chun,” *Applied Catalysis. B:Environmental.*, vol. 134–135, pp. 83–92, 2013.
- [40] P. Kulshrestha, R. F. Giese, and D. S. Aga, “Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: insights on factors affecting its mobility in soil,” *Environment Science. Technologic.*, vol. 38, no. 15, pp. 4097–4105, 2004.
- [41] S. Jiao, S. Zheng, D. Yin, L. Wang, and L. Chen, “Aqueous oxytetracycline degradation and the toxicity change of degradation compounds in photoirradiation process,” *Journal of Environment. Sciences.*, vol. 20, no. 7, pp. 806–813, 2008.
- [42] M. R. de Abreu, T. B. Arantes, S. Hermes-Silva, and E. Zaniboni-Filho, “Oxitetraciclina para marcação química de juvenis de piava *leporinus obtusidens*: Determinação de doses e duração do tratamento,” *Boletim do Instituto de Pesca*, vol. 40, no. 3, pp. 451–457, 2014.
- [43] F. J. Peng, L. J. Zhou, G. G. Ying, Y. S. Liu, and J. L. Zhao, “Antibacterial activity of the soil-bound antimicrobials oxytetracycline and ofloxacin,” *Environmental Toxicology and Chemistry.*, vol. 33, no. 4, pp. 776–783, 2014.

- [44] B. Lunestad and J. Goksøyr, "Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium Bjern," *Diseases of Aquatic Organisms.*, vol. 9, pp. 67–72, 1990.
- [45] V. K. Silva, M. W. Ferreira, and P. V. R. Logato, "Qualidade da água na piscicultura," 2001.
- [46] E. Caro, R. M. Marcé, P. A. G. Cormack, D. C. Sherrington, and F. Borrull, "Direct determination of ciprofloxacin by mass spectrometry after a two-step solid-phase extraction using a molecularly imprinted polymer," *Journal of Separation Science.*, vol. 29, no. 9, pp. 1230–1236, 2006.
- [47] K. Mitani and H. Kataoka, "Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry," *Analytica Chimica. Acta*, vol. 562, no. 1, pp. 16–22, 2006.
- [48] V. K. Balakrishnan, K. A. Terry, and J. Toito, "Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods," *Journal of Chromatography A*, vol. 1131, no. 1–2, pp. 1–10, 2006.
- [49] E. L. McClure and C. S. Wong, "Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters," *Journal of Chromatography A*, vol. 1169, no. 1–2, pp. 53–62, 2007.
- [50] A. M. Voigt *et al.*, "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a fast and simple method for the determination of several antibiotics in different aqueous matrices," *Environment. Chemistry.*, vol. 17, no. 1, pp. 54–74, 2020.
- [51] A. Rogstad and B. Weng, "Extraction and analysis by high-performance liquid chromatography of antibiotics in a drug delivery system for farmed fish," *Pharmaceutical Research and Development.*, vol. 82, no. 5, pp. 518–520, 1993.
- [52] F. Hernández, J. V. Sancho, M. Ibáñez, and C. Guerrero, "Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, no. 6, pp. 466–485, 2007.
- [53] C. Kim, H. D. Ryu, E. G. Chung, Y. Kim, and J. kwan Lee, "A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry," *Journal of Environmental Management.*, vol. 217, pp. 629–645, 2018.
- [54] S. Yudthavorasit, C. ChiaoChan, and N. Leepipatpiboon, "Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Microchim Acta*, vol. 172, no. 1, pp. 39–49, 2011.
- [55] M. Axel, K. Ewelina, B. Jenny-Maria, and K. Leif, "An online SPE LC-MS/MS method for the analysis of antibiotics in environmental water," *Environmental Science Pollution Research*, vol. 24, no. 9, pp. 8692–8699, 2017.
- [56] W. Kaewsuwan, P. Kanatharana, and O. Bunkoed, "Dispersive magnetic solid phase extraction using octadecyl coated silica magnetite nanoparticles for the extraction of tetracyclines in water samples," *Journal of Analytical Chemistry.*, vol. 72, no. 9, pp. 957–965, 2017.
- [57] N. Phiroonsoontorn, S. Sansuk, Y. Santaladchayakit, and S. Srijaranai, "The use of dissolvable

- layered double hydroxide components in an in situ solid-phase extraction for chromatographic determination of tetracyclines in water and milk samples,” *Journal of Chromatography. A*, vol. 1519, pp. 38–44., 2017.
- [58] W. H. Tsai, T. C. Huang, J. J. Huang, Y. H. Hsue, and H. Y. Chuang, “Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection,” *Journal of Chromatography. A*, vol. 1216, no. 12, pp. 2263–2269, 2009.
- [59] Y. Matsui, T. Ozu, T. Inoue, and T. Matsushita, “Occurrence of a veterinary antibiotic in streams in a small catchment area with livestock farms,” *Desalination*, vol. 226, no. 1–3, pp. 215–221, 2008.
- [60] F. Kaczala and S. E. Blum, “The occurrence of veterinary pharmaceuticals in the environment: A Review,” *Current Analytical Chemistry.*, vol. 12, no. 3, pp. 169–182, 2015.
- [61] M. E. Lindsey, M. Meyer, and E. M. Thurman, “Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry,” *Analytical Chemistry.*, vol. 73, no. 19, pp. 4640–4646, 2001.
- [62] S. Reverté, F. Borrull, E. Pocurull, and R. M. Marcé, “Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–(electrospray) mass spectrometry,” *Journal of Chromatography. A*, vol. 1010, no. 2, pp. 225–232, 2003.
- [63] L. Chen *et al.*, “Determination of fluoroquinolone antibiotics in environmental water samples based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Analytical Chemistry. Acta*, vol. 662, no. 1, pp. 31–38, 2010.
- [64] M. J. Marquez, C. J. Roncales, R. A. Tigcal, and E. Quinto, “Development of optical detection for antibiotic residues: oxytetracycline in freshwater aquaculture,” *MATEC Web of Conferences*, vol. 268, pp. 06013, 2019.
- [65] F. T. C. Moreira, A. H. Kamel, J. R. L. Guerreiro, and M. G. F. Sales, “Man-tailored biomimetic sensor of molecularly imprinted materials for the potentiometric measurement of oxytetracyclin,” *Biosensors Bioelectronics.*, vol. 26, no. 2, pp. 566–574, 2010.
- [66] A. Hulanicki, S. Glab, and F. Ingman, “Chemical sensors definitions and classification,” *Pure and Applied Chemistry.*, vol. 63, no. 9, pp. 1247–1250, 1991.
- [67] H. Varela, M. Malta, and R. M. Torresi, “Técnicas in situ de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo,” *Química. Nova*, vol. 23, n. 5, 2000.
- [68] R. P. Buck, E. Lindner, W. Kutner, and G. Inzelt, “Piezoelectric chemical sensors,” *Pure and Applied Chemistry*, vol. 76, no. 6, p. 1139, 2004.
- [69] G. G. and Guilbault and J. Hlavay, “Applications of the piezoelectric crystal detector in analytical chemistry,” *analytical chemistry.*, vol. 49, no. 13, pp. 3–15, 1977.
- [70] metode penelitian Nursalam, 2016 and A. . Fallis, “Avaliação de sensores para captação de corrente em um sistema para medição de impedância elétrica em ressonadores piezelétricos,” *Journal of Chemical Information. Modeling*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2013.
- [71] S. Bruckenstein and M. Shay, “Experimental aspects of use of the quartz crystal microbalance in solution,” *Electrochemistry*, vol. 30, no. 10, pp. 1295–1300, 1985.

- [72] R. L. Bunde, E. J. Jarvi, and J. J. Rosentreter, "Piezoelectric quartz crystal biosensors," *Talanta*, vol. 46, no. 6, pp. 1223–1236, 1998.
- [73] J. Koszinowski, H. Müller, and O. Piringer, "Odor pollution in the environment and the detection instrumentation," *Journal of Scientific Research Development*, vol. 13, no. 12, pp. 310–312, 1980.
- [74] L. Chen, S. Xu, and J. Li, "Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications," *Sociedade Quimica Revisão*, vol. 40, no. 5, pp. 2922–2942, 2011.
- [75] G. Vasapollo *et al.*, "Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, no. 9, pp. 5908–5945, 2011.
- [76] J. Li, G. Wei, and Y. Zhang, "Molecularly imprinted polymers as recognition elements in sensors." Elsevier B.V., 2012.
- [77] A. Azizi and C. S. Bottaro, "A critical review of molecularly imprinted polymers for the analysis of organic pollutants in environmental water sample," *Journal of Chromatography A*, p. 460603, 2019.
- [78] V. Pichon and F. Chapuis-Hugon, "Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 622, no. 1–2, pp. 48–61, 2008.
- [79] M. G. Santos, L. C. de C. Abrão, L. A. de S. Freitas, G. de O. I. Moraes, M. M. de Lima, and E. C. Figueiredo, "Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências," *Scientia Chromatographica*, vol. 4, no. 3, pp. 161–195, 2012.
- [80] J. F. F. Aguilar, J. M. Miranda, J. A. Rodriguez, M. E. Paez-Hernandez, and I. S. Ibarra, "Selective removal of tetracycline residue in milk samples using a molecularly imprinted polymer," *Journal of Polymer Research*, vol. 27, no. 7, pp. 1–12, 2020.
- [81] H. Yan and H. R. Kyung, "Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer," *international journal of molecular sciences*, vol. 7, no. 5–6, pp. 155–178, 2006.
- [82] P. A. G. Cormack and A. Z. Elorza, "Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation Peter," *Journal of Chromatography B*, vol. 804, no. 1, pp. 173–182, 2004.
- [83] O. Kotrotsiou and C. Kiparissides, "Water treatment by molecularly imprinted materials," em *Materiais nanoscopios para purificação de água*, Elsevier Inc., 2019, pp. 179–230.
- [84] E. Caro, R. M. Marcé, P. A. G. Cormack, D. C. Sherrington, and F. Borrull, "Synthesis and application of an oxytetracycline imprinted polymer for the solid-phase extraction of tetracycline antibiotics," *Analytical Chemistry Acta*, vol. 552, no. 1–2, pp. 81–86, 2005.
- [85] T. Jing *et al.*, "Preparation of mixed-templates molecularly imprinted polymers and investigation of the recognition ability for tetracycline antibiotics," *Journal of Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, no. 10, pp. 2218–2224, 2010.
- [86] G. L. Gong, L. Jia, H. Li, and X. J. Qi, "Preparation and characterization of molecular imprinted polymers of tetracycline antibiotics by mixed-templates," *Applied Mechanics Materials*, vol. 128–129, pp. 407–410, 2012.
- [87] R. Suedee, T. Srichana, T. Chuchome, and U. Kongmark, "Use of molecularly imprinted polymers

- from a mixture of tetracycline and its degradation products to produce affinity membranes for the removal of tetracycline from water,” *Journal of Chromatography. B*, vol. 811, no. 2, pp. 191–200, 2004.
- [88] “Solvent properties.”. Interchim. Disponível em: <http://www.interchiminc.com/flash-prep-hplc-solvent-properties.html>. (acedido em 05/02/2021)
- [89] H. Zhao, H. Wang, X. Quan, and F. Tan, “Amperometric sensor for tetracycline determination based on molecularly imprinted technique,” *Procedia Environmental. Sciences*, vol. 18, pp. 249–257, 2013.
- [90] P. Sikiti, T. A. M. Msagati, B. B. Mamba, and A. K. Mishra, “Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for the remediation of PCBs and dioxins in aqueous environments,” *Journal of Environmental. Health Science and Engineering*, vol. 12, no. 1, pp. 1–8, 2014.
- [91] S. Rakshit, E. J. Elzinga, R. Datta, and D. Sarkar, “In situ attenuated total reflectance fourier-transform infrared study of oxytetracycline sorption on magnetite,” *Journal of Environmental Quality*, vol. 42, no. 3, pp. 822–827, 2013.
- [92] P. R. da Silva, “Influência da composição da membrana polimérica na sensibilidade dos sensores de massa,” universidade de Aveiro, 2007. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10773/4860>. (acedido em 05/02/2021)

Anexo A- Tabelas

Tabela A1- Antibióticos utilizados como agentes ativos, na formulação de medicamentos para peixes na Europa.

Antibiótico/agente ativo	Países da Europa autorizado	Antibiótico/agente ativo	Países da Europa autorizado
Cloridrato de Oxitetraciclina	Reino unido Espanha Eslovénia Eslováquia Roménia Portugal Polónia Lituânia Itália Letónia Bulgária Croácia República Checa Irlanda Grécia França Finlândia	Florfenicol	Reino unido Espanha Eslovénia Eslováquia Roménia Portugal Noruega Lituânia Itália Letónia Grécia França Finlândia Dinamarca Bulgária Croácia República Checa Hungria
Oxitetraciclina	Itália Irlanda Chipre	Ácido oxolínico	Noruega Grécia França Dinamarca
Clorotetraciclina	Itália	Cloridrato de Enrofloxacina	Roménia
Oxitetraciclina di-hidratada	Itália	Cloridrato de Clortetraciclina	Itália
Sulfadiazina, Trimetoprim	Eslováquia Grécia Itália Dinamarca Alemanha França	Flumequina	Bulgária Espanha Roménia Itália França Hungria
Enrofloxacina	Bulgária		

Tabela A2 - Respostas do sensor revestido com o MIP-1, aquando injeção no sistema FIA de soluções de OTC, preparadas em água Milli-Q. Linha de base com água Milli-Q, com um caudal de 0,77 mL/min.

Soluções (ppm)	Soluções (mol/L)	ΔF (Hz)	Média (Hz)	Desvio
5,00	1,0062E-05	8	8,0	0,0000
		8		
		8		
		8		
10,0	1,0062E-07	9	9,0	0,5000
		10		
		9		
		8		
25,0	5,0312E-05	11	10,5	0,5000
		11		
		10		
		10		
50,0	1,0062E-04	14	14,5	0,5000
		15		
		15		
		14		
80,0	1,61E-04	18	17,0	0,5000
		16		
		17		
		17		
100,0	2,01E-04	19	20,0	0,6667
		20		
		21		
125,0	2,52E-04	23	24,0	0,5000
		24		
		24		
		25		
150,0	3,02E-04	26	26	-
175,0	3,52E-04	27	27	-
200,0	4,02E-04	28	28	-
250,0	5,03E-04	27	27	-
300,0	6,04E-04	27	27	-

Tabela A3- Respostas do sensor revestido com o MIP-1, aquando injeção no sistema FIA de soluções de OTC, preparadas em tampão HEPES 0,001M. Linha de base em tampão HEPES 0,001M, com um caudal de 0,73 mL/min.

Soluções (ppm)	Soluções (mol/L)	ΔF (Hz)	Média (Hz)	Desvio
5,00	5,031E-06	8	7,2	0,3750
		7		
		7		
		7		
10,0	1,006E-05	12	11,5	1,0000
		13		
		11		
		10		
25,0	2,520E-05	19	17,5	1,0000
		16		
		18		
		17		
50,0	5,030E-05	33	31,5	1,0000
		31		
		30		
		32		
75,0	7,550E-05	45	43,0	1,0000
		42		
		43		
		42		
100,0	1,010E-04	53	53,0	
125,0	1,260E-04	55	55,0	
200,0	2,010E-04	55	55	-

Tabela A4 - Respostas do sensor revestido com o MIP-2, aquando injeção no sistema FIA, de soluções de OTC, preparadas em tampão *HEPES* 0,001M. Linha de base em tampão *HEPES* 0,001M, com um caudal de 0,78 mL/min.

Soluções (ppm)	Soluções (mol/L)	ΔF (Hz)	Média (Hz)	Desvio
5,00	1,006E-05	3	3,8	0,3750
		4		
		4		
		4		
10,0	2,012E-05	6	5,5	0,5000
		5		
		6		
		5		
25,0	5,031E-05	7	8,2	0,7500
		9		
		9		
		8		
50,0	1,006E-04	15	14,8	0,3750
		14		
		15		
		15		
40,0	8,050E-05	12	12,5	0,5000
		13		
		13		
		12		
30,0	6,04E-05	10	9,3	0,3750
		9		
		9		
		9		
75,0	1,509E-04	19	19,0	
100,0	2,012E-04	20	20,0	
200,0	4,025E-04	20	20	-

Tabela A5 - Respostas do sensor revestido com o MIP-3, aquando injeção no sistema FIA, de soluções de OTC, preparadas em tampão HEPES 0,001M. Linha de base em tampão HEPES 0,001M, com um caudal de 0,73 mol/min.

Soluções (ppm)	Soluções (mol/L)	ΔF (Hz)	Média (Hz)	Desvio
20,0	4,02E-05	7	6,5	0,5000
		7		
		6		
		6		
30,0	6,037E-05	7	7,2	0,3750
		8		
		7		
		7		
40,0	8,050E-05	8	8,0	0,0000
		8		
		8		
		8		
50,0	1,006E-04	9	9,0	0,0000
		9		
		9		
		9		
100,0	2,012E-04	14	13,7	0,5000
		14		
		13		
		13		
60,0	1,207E-04	10	10,0	0,0000
		10		
		10		
		10		
80,0	1,610E-04	12	11,8	0,3750
		12		
		12		
		11		
15,0	3,019E-05	5	5,7	0,3750
		6		
		6		
		6		
200,0	4,025E-04	14	14,5	0,3750
		15		
		15		
		15		
150,0	3,019E-04	14	13,5	0,500
		13		
		13		
		14		

Tabela A6 - Respostas do sensor revestido com o MIP-4, aquando injeção no sistema FIA, de soluções de OTC, preparadas em tampão HEPES 0,001M. Linha de base em tampão HEPES 0,001M, com um caudal de 0,80 mL/min.

Soluções (ppm)	Soluções (mol/L)	ΔF (Hz)	Média (Hz)	Desvio
1,00	2,01E-06	4	4,5	0,5000
		5		
		5		
		4		
2,00	4,025E-06	8	8,3	0,3750
		8		
		9		
		8		
4,00	8,050E-06	17	17,5	0,5000
		18		
		18		
		17		
6,00	1,207E-05	28	27,8	0,3750
		27		
		28		
		28		
8,00	1,610E-05	35	36,0	0,5000
		36		
		37		
		36		
10,0	2,012E-05	46	47,3	0,7500
		47		
		48		
		48		
20,0	4,025E-05	49	49,0	
30,0	6,037E-05	50	50,0	

Anexo B- Espectros FTIR-ATR

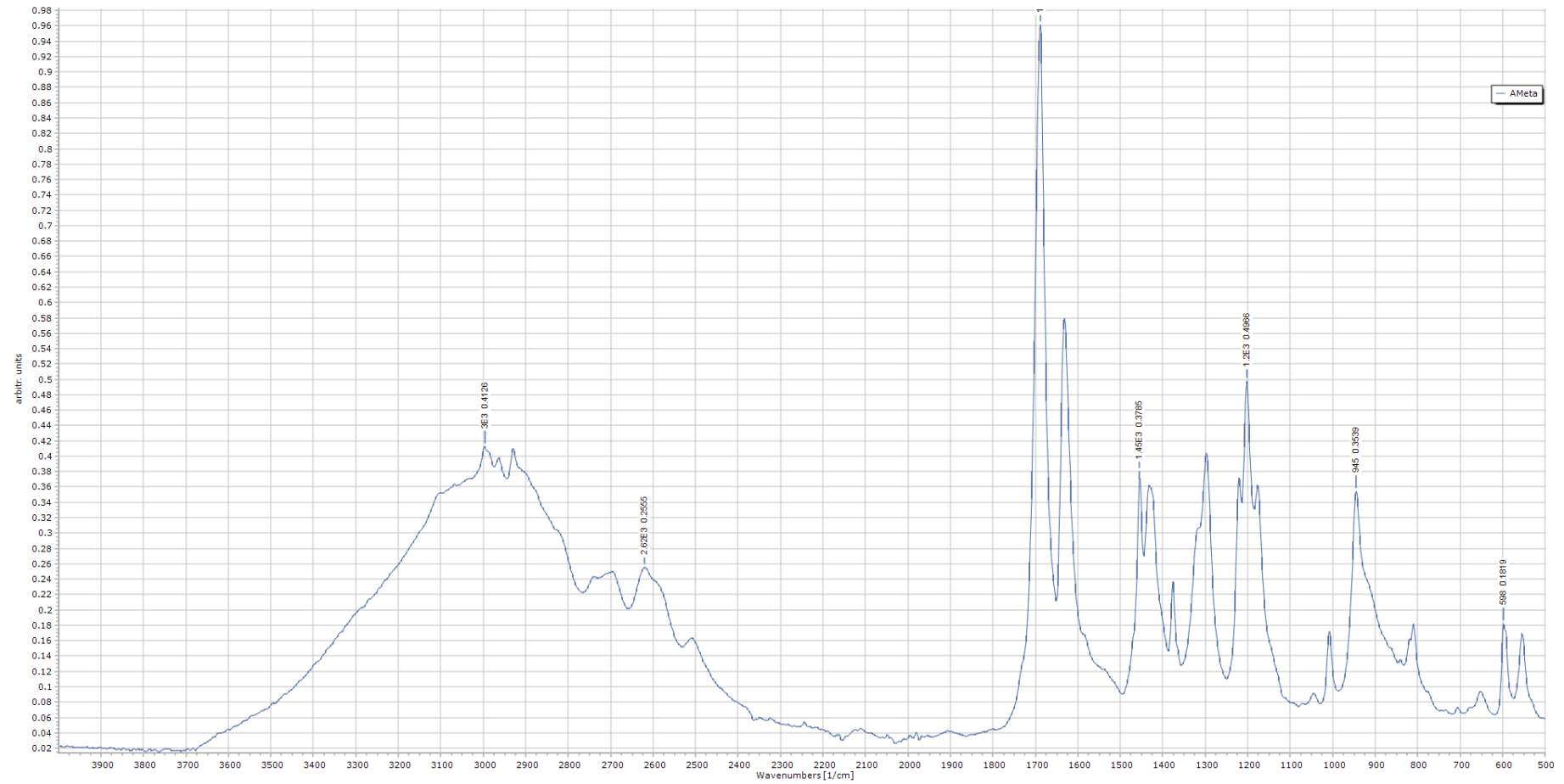


Figura B1 -Espectro obtido por FTIR-ATR do MAA.

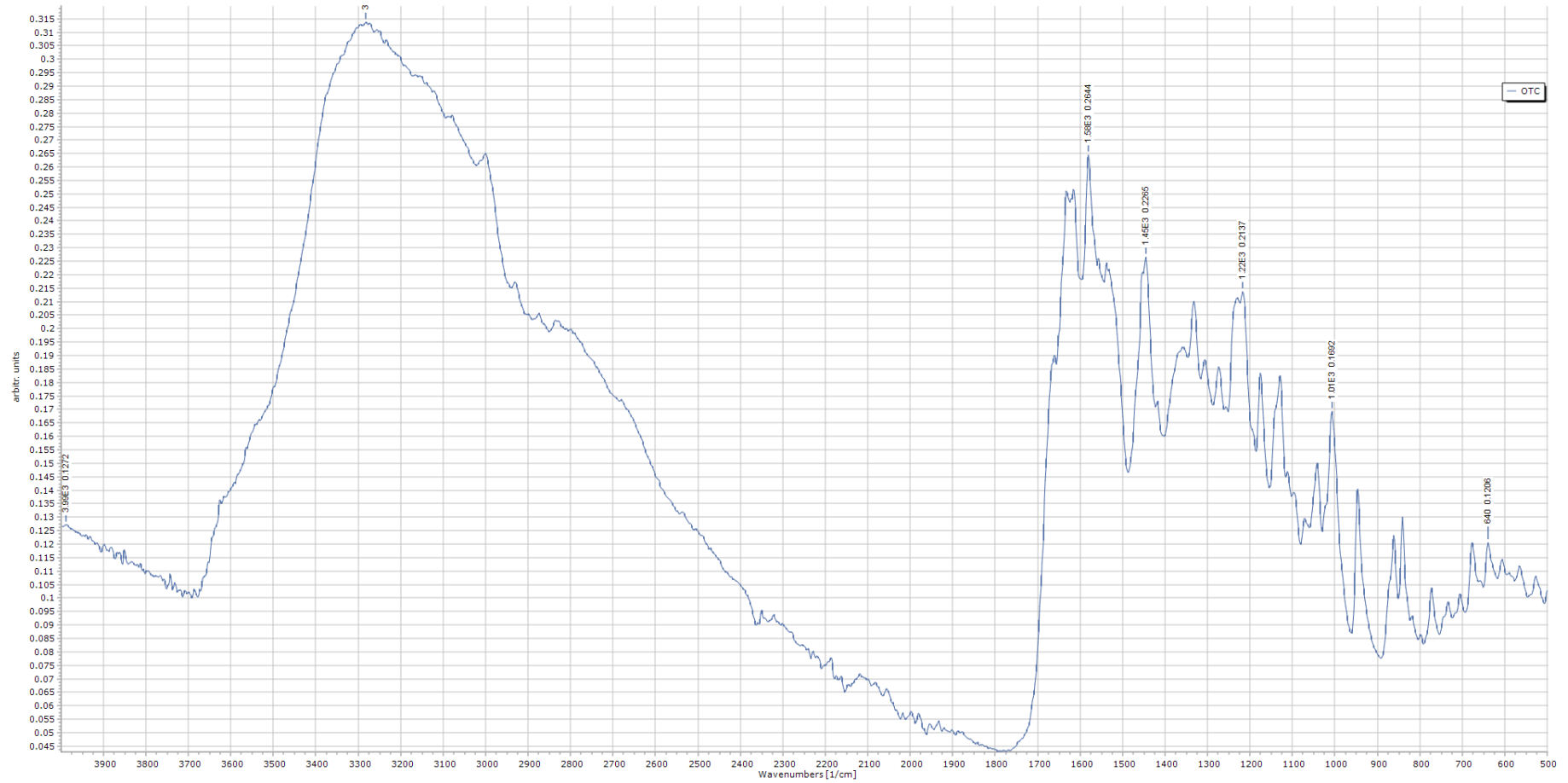


Figura B2 -Espectro obtido por FTIR-ATR da OTC.

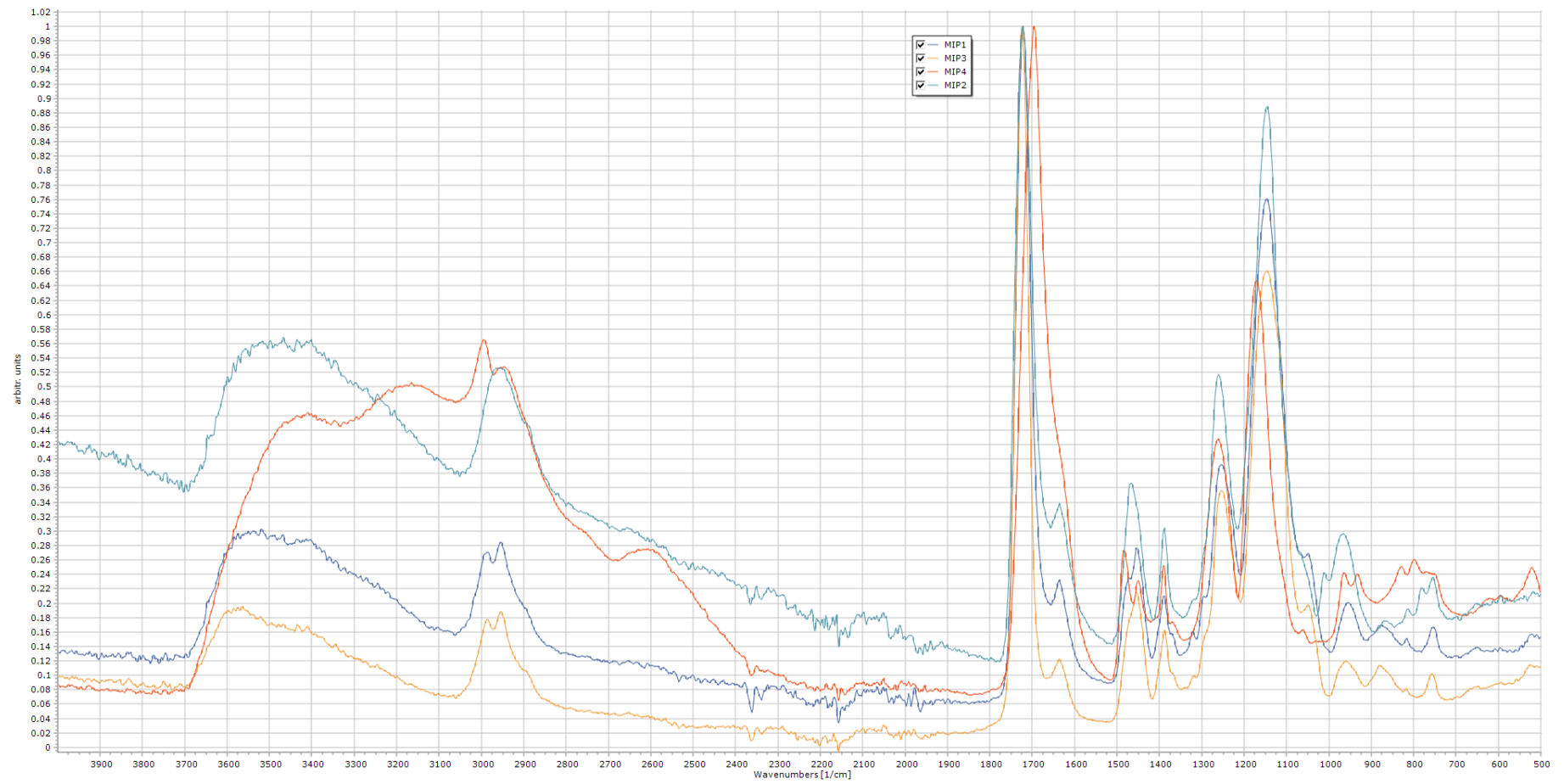


Figura B3 -Espectro obtido por FTIR-ATR do MIP-1,2,3 e 4.

Anexo C- Gráficos

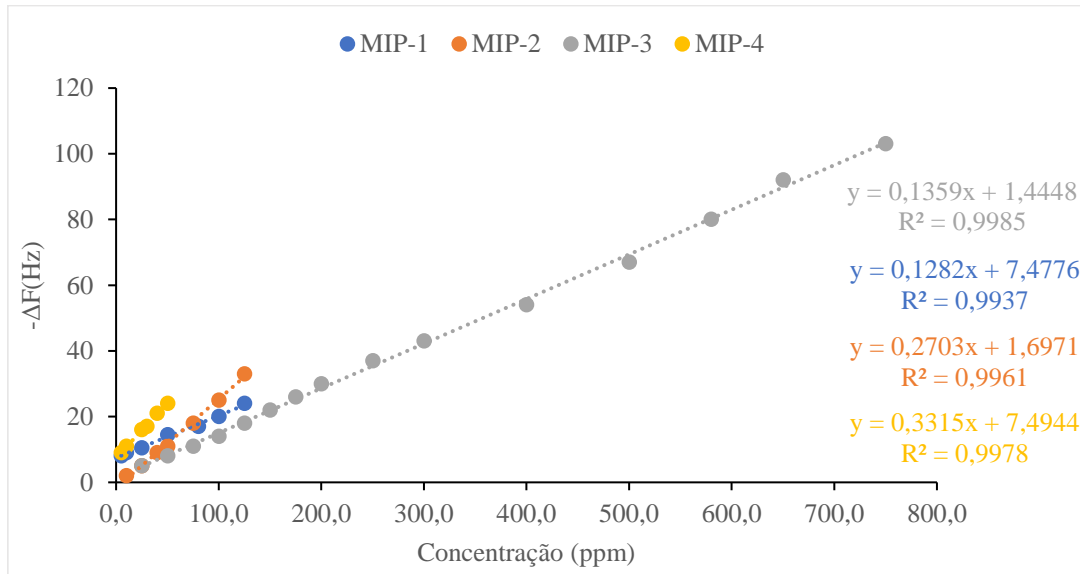


Figura C1- Representação gráfica da zona de linearidade das curvas de calibração em ppm de OTC em água Milli-Q, para os cristais revestidos com o MIP-1, MIP-2, MIP-3 e MIP-4 com um caudal de 0,77 mL/min para o MIP-1, MIP-2 e MIP-3 e com um caudal 0,80 mL/min para o MIP-4

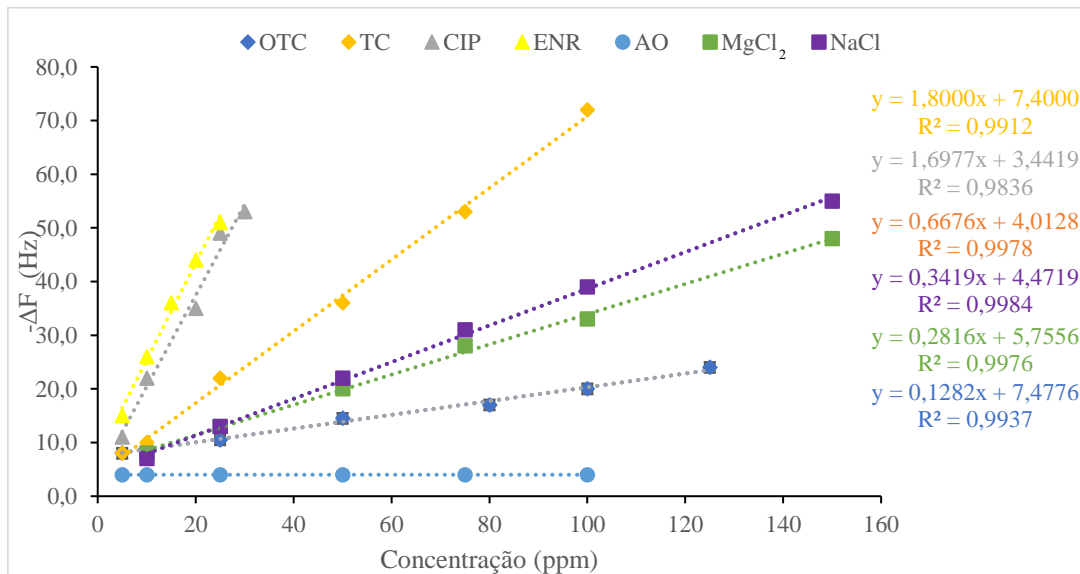


Figura C2-Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em ppm, e em água Milli-Q, com um caudal de 0,77 mL/min. Cristal revestido com MIP-1.

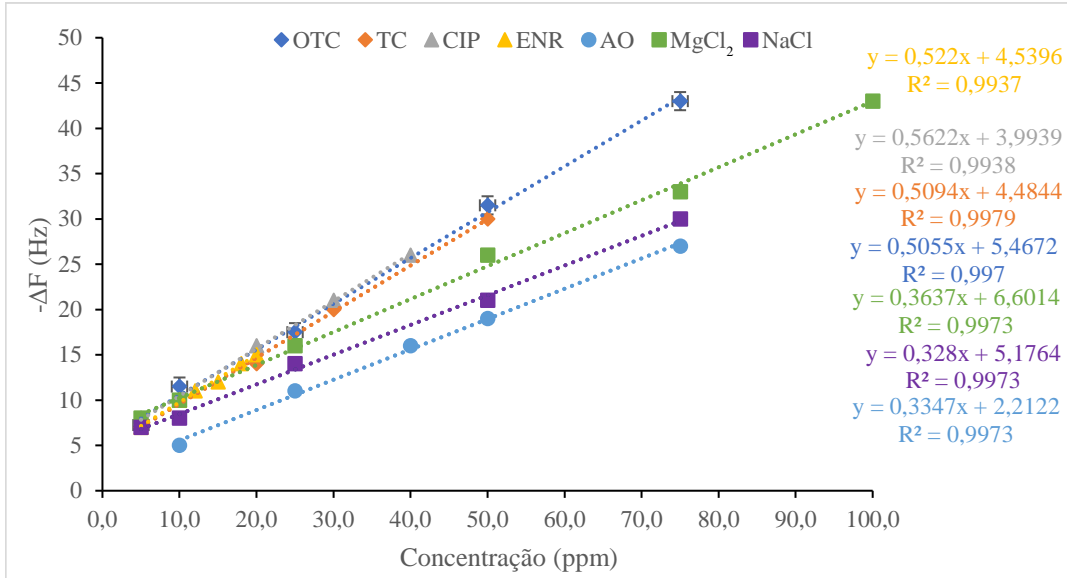


Figura C3- Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em ppm, e em tampão HEPES de 0,001M, com um caudal de 0,73 mL/min. Cristal revestido com MIP-1.

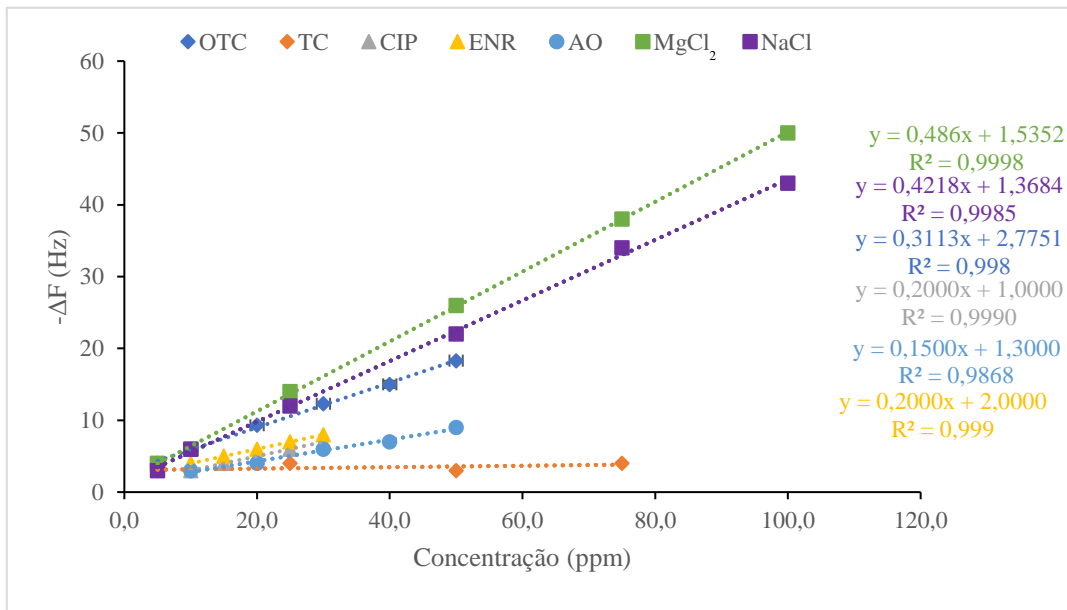


Figura C4 - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em ppm, em tampão HEPES de 0,001M, com um caudal de 0,73 mL/min. Cristal revestido com MIP-2.

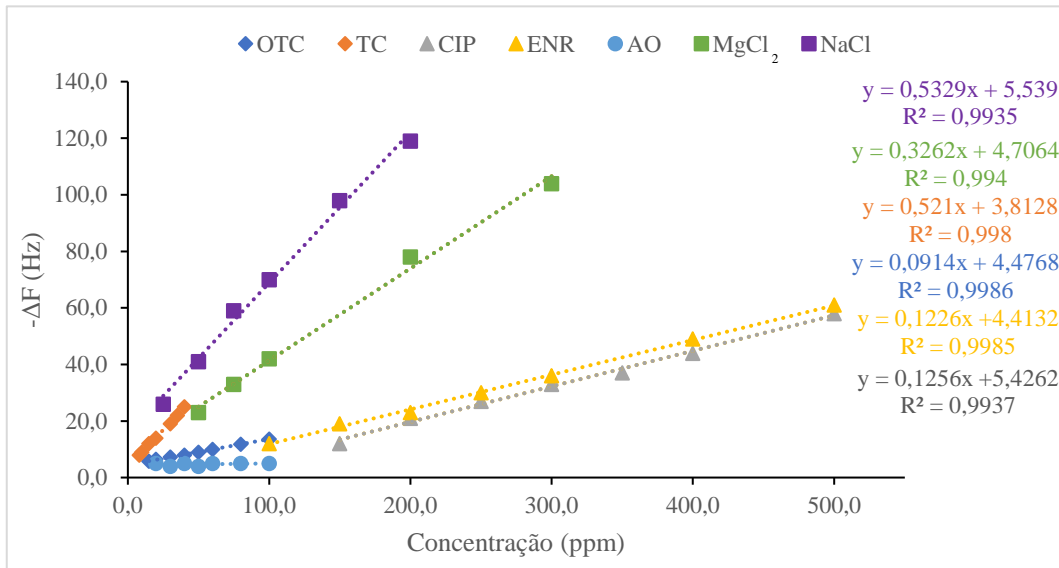


Figura C5 - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da oxitetraciclina e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em ppm, e em tampão HEPES de 0,001M, com um caudal de 0,76 mL/min. Cristal revestido com MIP- 3.

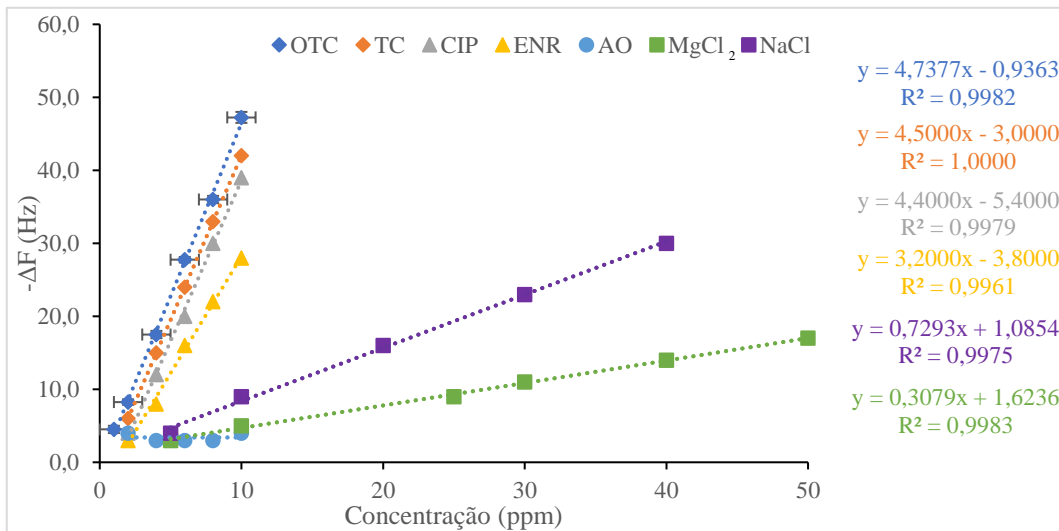


Figura C6 - Representação gráfica da zona de linearidade da curva de calibração da OTC e dos interferentes, NaCl, MgCl₂, TC, CIP, ENR e AO, em ppm, e em tampão HEPES de 0,001M, com um caudal de 0,80 mL/min. Cristal revestido com MIP-4.