

Elétrodo de pasta de carbono molecularmente impresso para deteção voltamétrica de Furazolidona

Vítor Daniel da Costa Pereira

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de
computação e instrumentação médica**

Orientador: Doutora Cristina Delerue-Matos

Co-orientador: Doutor João Pacheco

Porto, 23 de Outubro de 2013

*"A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos,
depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós".*

Marcel Proust (1871-1922)

I. AGRADECIMENTOS

Ao Grupo de Reação e Análises Químicas em particular ao Dr. João Pacheco pela oportunidade de realização da dissertação e pela orientação do mesmo.

À minha orientadora, Dr. Cristina Delerue-Matos pela importante ajuda e orientação durante a dissertação.

À Susana Machado, pela sua ajuda e disponibilidade.

Ao Instituto Superior de Engenharia do Porto por me abrir as portas e deste modo concluir o meu mestrado.

Aos meus amigos, pelos momentos de boa disposição e interajuda que proporcionaram ao longo destes anos.

Aos meus pais, Alberto Pereira e Ana Paula Costa, pelo seu amor e compreensão ao longo deste percurso académico. Por estarem sempre disponíveis para ajudar e pela força que me deram nesta etapa importante da minha vida. Foram e sempre serão as pessoas que mais amo neste mundo.

À minha irmã, Ana Pereira, pela sua alegria e paciência que manteve ao longo destes 5 anos.

À Daniela Silva, pelo seu companheirismo e carinho e por ser uma peça fundamental durante todas as etapas da dissertação. Nada do que eu possa escrever vai ser suficiente para lhe agradecer tudo o que fez por mim.

A Deus.

II. Resumo

A furazolidona é uma substância ativa do medicamento Giarlam que contém um espectro anti-bacteriano relativamente amplo e que é frequentemente usado para tratar certas doenças bacterianas e protozoárias no homem. A maioria dos fármacos exige uma dosagem que garanta os níveis de segurança e eficácia de atuação. A necessidade de dosear os medicamentos e os seus metabólitos exige o desenvolvimento constante de métodos analíticos eficientes.

Neste trabalho desenvolveu-se um novo sensor eletroquímico para a deteção da furazolidona, baseado num eléctrodo de pasta de carbono modificado com um polímero molecularmente impresso. A procura de novos materiais que permitam uma melhor seletividade e sensibilidade aos sistemas de deteção é especialmente importante no desenvolvimento de métodos analíticos. Os polímeros molecularmente impressos enquadram-se nesse perfil e o seu uso tem vindo a ser cada vez mais frequente como ferramenta importante em química analítica. Assim, sintetizou-se um polímero com cavidades seletivas para a Furazolidona. Este polímero foi, misturado com grafite e parafina de modo a produzir uma pasta de carbono. Uma seringa de plástico foi usada como suporte da pasta de carbono. O comportamento eletroquímico do sensor foi avaliado e diversas condições de utilização foram estudadas e otimizadas. O sensor apresenta um comportamento linear entre a intensidade do pico e a concentração numa gama de concentrações entre 1 e 100 μM , um limite de deteção de 1 μM e uma precisão (repetibilidade) inferior a 7%. A aplicabilidade do sensor fabricado em amostras complexas foi avaliada pela deteção do fármaco em amostras de urina.

Palavras-chave: Furazolidona, Polímero molecularmente impresso, Sensor eletroquímico, Pasta de carbono, Voltametria

Abstract

Furazolidone is a drug with a antibacterial spectrum relatively wide which is often used for treating certain bacterial infections and protozoal infections in human. Most drugs require a dosage levels to ensure safety and effectiveness of action. The need to dispense the drugs and their metabolites requires the constant development of efficient analytical methods.

In this work, a novel electrochemical sensor for furazolidone detection was developed, by using molecular imprinted a carbon paste electrode. The development of new analytical methods requires the search of strategies for improving both the sensitivity and selectivity. The molecular imprinting technology fits that requirement, and is more often used as an important tool in analytical chemistry. A polymer white imprinted cavities for connection with furazolidone molecules was prepared. The polymer was mixed with graphite and paraffin in order to produce a carbon paste, which was place in a plastic syringe with a copper wire used for connection with the electrochemical equipment. Several experimental conditions have been studied and optimized, such as the electrochemical behavior, the incubation and the extraction conditions.

The fabricated sensor shows a linear behavior between the peak intensity and the concentration of furazolidone from 1 to 100 μM , a limit of detection of 1 μM , and a precision (evaluated by standard deviations) less than 7%. The sensor was successfully used in the detection of the drug in complex samples, such as urine.

Keywords: Furazolidone, Molecular imprinted polymer, electrochemical sensor, Carbon paste eletrode, Voltammetry

III. Lista de abreviaturas

ACSS – Administração Central do Sistema de Saúde

AIBN – Azobisisobutyronitrile

AIM – Autorização de introdução do mercado

CC – Corrente contínua

CV – Voltametria cíclica

DPP – Polarografia de pulso diferencial

EGMA – Elthylene glycol dimethylacrylate

EMA – Agência Europeia do Medicamento

FDZ – Furazolidona

GPES – General Purpose Electrochemical System

HPLC – High performance liquid chromatography

LSV – Voltametria de varrimento linear

MAO – Monoaminoxidase

MIP – Polímero molecularmente impresso

NIP – Polímero não-impresso

NIPP – Polarografia de pulso normal

PBS – solução tampão fosfato

ppm – parte por milhão

SWV – Voltametria de onda quadrada

IV. Lista de figuras

Figura 1.1 - Ciclo do medicamento	12
Figura 1.2 – Formula química da Furazolidona	18
Figura 1.3 – Representação do MIP	23
Figura 1.4 - Método covalente VS Método não-covalente	25
Figura 1.5 – Potencióstato	26
Figura 1.6 - Voltametria de varrimento linear.....	27
Figura 1.7 - Polarogramas de corrente contínua (CC)	28
Figura 1.8 - Polarografia de impulso normal.....	29
Figura 1.9 - Polarografia de pulso diferencial	30
Figura 1.10 - Voltametria de onda quadrada	31
Figura 1.11 – Voltametria Cíclica	32
Figura 1.12 – Elétrodo de pasta de carbono	33
Figura 1.13 – Elétrodos de pasta de carbono Piston-driven	34
Figura 2.1 - Fotografia do equipamento Autolab Metrohm, modelo PGSTAT 12.	37
Figura 2.2 – Fotografia da micropipetas usadas ao longo do trabalho	38
Figura 2.3 – Fotografia da preparação da pasta.....	40
Figura 2.4 – Fotografia da pasta de carbono preparada.....	40
Figura 2.5 – Fotografia do elétrodo fabricado.....	41
Figura 2.6 – Fotografia do procedimento da compactação da pasta de carbono	41
Figura 2.7 – Fotografia relativa ao procedimento de incubação	42
Figura 2.8 – Fotografia da célula eletroquímica.....	43
Figura 2.9 – Condições da voltametria de onda quadrada	44
Figura 2.10 – Fotografia do procedimento de remoção em NaOH	45
Figura 3.1 – Voltamogramas relativos à análise com sensores MIP e NIP obtidos por eletropolimerização num elétrodo de pasta de carbono vítreo. Eletrólito de suporte: H ₂ SO ₄ 0,5M; Voltametria de onda quadrada 100 Hz; Incubação 10 minutos em FDZ 1mM	47
Figura 3.2 – Espectros de absorção das extrações de FDZ do polímero preparado.	48
Figura 3.3 – Voltamogramas relativos à análise com sensor MIP e NIP após incubação durante 10 minutos em FDZ 1mM. Eletrólito de suporte: H ₂ SO ₄ 0,5M; Voltametria de onda quadrada 100 Hz	50

Figura 3.4 – Concentração da intensidade de corrente do pico de FDZ obtido com um MIP e um NIP.....	51
Figura 3.5 – Voltamogramas de redução da FDZ em função do pH de medição. Voltametria de onda quadrada 100 Hz; Incubação 10 minutos em FDZ 1mM	52
Figura 3.6 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do pH de medição.....	53
Figura 3.7 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função da quantidade de polímero usado na preparação da pasta de carbono	54
Figura 3.8 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do tempo de incubação	55
Figura 3.9 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do pH do meio de incubação	57
Figura 3.10 – Gráfico da intensidade de corrente para incubações com e sem agitação magnética.....	58
Figura 3.11 – Voltamogramas relativos ao estudo do tempo de extração em NaOH 0,1M. Eletrólito de suporte: H ₂ SO ₄ 0,5M; Voltametria de onda quadrada 100 Hz; Incubação 10 minutos em FDZ 1mM.....	60
Figura 3.12 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do tempo de remoção em NaOH 0,1M	61
Figura 3.13	62
Figura 3.14 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de FDZ	63
Figura 3.15 – Estudo na seletividade do sensor na presença de 3 interferentes.....	66
Figura 3.16 – Voltamogramas relativos à aplicação do sensor em amostras de urina	68

V. Lista de tabelas

Tabela 1 - Tabela referente à repetibilidade dos ensaios.....	64
Tabela 2 - Tabela referente à reprodutibilidade dos ensaios	65

Índice

1. Introdução.....	11
1.1. Medicamentos de uso humano	11
1.2. Furazolidona (FZD)	17
1.3. Polímeros molecularmente impressos	20
1.4. Técnicas voltamétricas.....	24
1.4.1. Eléctrodo de pasta de carbono.....	31
2. Parte experimental.....	35
2.1. Reagentes e soluções	35
2.2. Equipamento	36
2.3. Síntese polímero molecularmente impresso.....	37
2.4. Preparação do Sensor.....	38
2.5. Medições Electroquímicas.....	41
2.6. Preparação das amostras.....	44
3. Resultados e discussão.....	45
3.1. Preparação do sensor	45
3.2. Comportamento electroquímico do sensor.....	48
3.2.1. Comparação entre MIP e NIP	48
3.2.2. pH de medição.....	50
3.2.3. Otimização da quantidade de polímero na pasta de carbono	52
3.3. Otimização das condições de incubação	53
3.3.1. Tempo	54
3.3.2. pH de incubação.....	55
3.3.3. Efeito agitação magnética.....	56
3.4. Otimização das condições de remoção	57
3.4.1. Solvente de remoção	57
3.4.2. Tempo de remoção	57
3.5. Performance analítica	60
3.5.1. Curva de calibração.....	60
3.5.2. Repetibilidade e Reprodutibilidade.....	62
3.5.3. Seletividade	63
3.6. Aplicação em amostra real (urina)	65
4. Conclusão	67
Referências	69

1. Introdução

1.1. Medicamentos de uso humano

Durante todo o seu ciclo de vida, o medicamento para uso humano está sujeito a processos de qualidade, segurança e eficácia (*figura 1.1*). Os diferentes intervenientes durante o processo (fabricantes, distribuidores, prescritores, farmácias e outros locais de venda) estão sujeitos a um conjunto de obrigações e procedimentos para que esses três processos estejam sempre garantidos. ^[25]

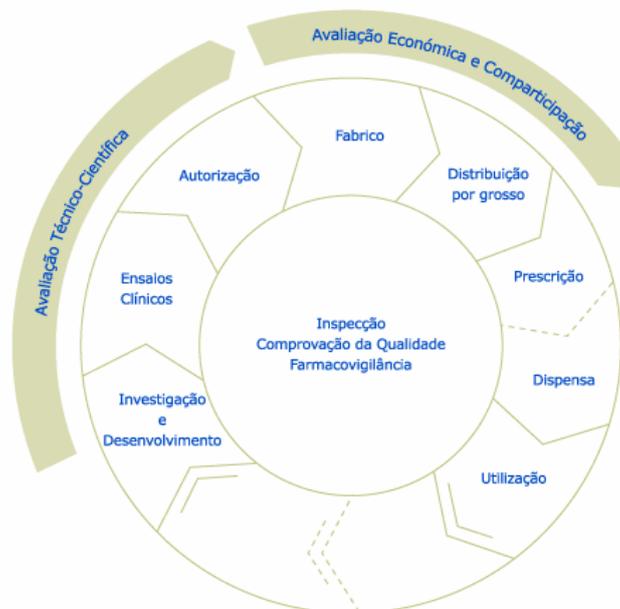


Figura 1.1 - Ciclo do medicamento ^[25]

- **Investigação e desenvolvimento**

Antes que um novo medicamento seja descoberto, os investigadores terão de descobrir qual o tratamento mais adequado e a causa para o seu aparecimento. Durante este processo aparecerão questões a serem resolvidas tais como: Como os genes se alteram? Como é que isso afeta as proteínas traduzidas? Como é que as

proteínas interagem uma com as outras nas células vivas? As células modificadas alteram o tecido onde se encontram? Como a doença afeta o paciente? Estas são questões que terão que ser resolvidas através da pesquisa, da investigação, sendo esta base de conhecimento a resolução do problema ^[26].

Apesar de as tecnologias e ferramentas estarem a evoluir com o passar dos anos, o desenvolvimento de um medicamento resulta de vários anos de pesquisa, sendo muitas vezes, um trabalho arduo e sem resultados imediatos. Se a pesquisa for bem-sucedida, os investigadores terão ainda um longo caminho a percorrer tentando passar o conhecimento adquirido na pesquisa para o desenvolvimento do tratamento/medicamento.

- **Ensaio Clínicos**

Como foi dito anteriormente, o medicamento antes de entrar em comercialização, tem que demonstrar, primeiro, a sua eficiência, qualidade e segurança. Para assegurar o sucesso desses critérios são elaborados vários ensaios clínicos que vão recolher informações que mais tarde irão servir de base para o processo de obtenção da autorização de introdução do mercado (AIM).

Esta fase permite, entre outros casos, obter informações preciosas acerca da segurança do medicamento, nomeadamente as reações mais adversas e esperadas bem como interações medicamentosas com outros medicamentos administrados simultaneamente. Os ensaios clínicos envolvem vários participantes voluntários. Para garantir que estes ensaios são conduzidos de forma justa, há inúmeras regras e critérios que orientam o desenho do estudo, as qualificações e treino dos investigadores, a monitorização constante de todos os centros de ensaio e a obtenção do consentimento do potencial do ensaio após apresentação dos riscos e potenciais benefícios dessa participação. Todos os participantes em ensaios clínicos são livres de sair do ensaio clínico em qualquer momento. Os ensaios clínicos normalmente são feitos através de quatro fases.

Na primeira fase um medicamento experimental é administrado pela primeira vez em seres humanos. Os ensaios clínicos desta primeira fase focam-se

principalmente na segurança e tolerância ao medicamento. Na fase dois o ensaio clínico foca-se na eficácia do medicamento experimental no tratamento de uma doença ou condição médica. Também é recolhida informação sobre a segurança do medicamento experimental, efeitos secundários e potenciais riscos. Nesta fase, os investigadores trabalham para determinar as dosagens mais eficazes para o medicamento e o método mais apropriado de administração. Relativamente à fase três, os investigadores testam os resultados dos ensaios clínicos anteriores mas em populações maiores e recolhem informação adicional acerca da eficácia e segurança do medicamento experimental. Esta fase envolve normalmente entre várias centenas a vários milhares de participantes de vários sítios assim como muitos médicos investigadores. Os ensaios clínicos da fase quatro – também conhecidos por “estudos pós-comercialização” – são conduzidos após a aprovação regulamentar de um medicamento. Através destas experiências, os investigadores recolhem informação adicional acerca dos riscos a longo prazo, benefícios e otimização do seu uso. Estes ensaios envolvem frequentemente milhares de indivíduos e podem decorrer durante anos. [42]

- **Autorização**

Segundo a Infarmed^[25] para que um medicamento seja colocado no mercado, é preciso que qualquer agência de medicamento do Estado Membro da União Europeia ou a Agência Europeia do Medicamento (EMA) conceda uma Autorização de Introdução no Mercado (AIM).

De modo a garantir a eficiência, segurança e qualidade dos medicamentos a sua aprovação obtém-se pela aprovação de regras e procedimentos que compõe o Sistema Europeu de Regulação, de qual Portugal faz parte. A obtenção de autorização de introdução no mercado de um novo medicamento pode ser um processo extremamente complexo, sobretudo tendo em conta o grande número de sistemas regulamentares nacionais e internacionais. É um processo rigoroso que obedece os mais elevados padrões de qualidade de modo a garantir a proteção da saúde pública.

Na Europa, já é habitual a autorização do medicamento em 10 ou mais países simultaneamente. Isto pode levar de dois a três anos para gerar os dados para apresentar às autoridades reguladoras e o mesmo tempo para responder a múltiplas solicitações de informação antes do lançamento.

- **Fabrico**

Depois de consumada a autorização o próximo passo é o fabrico do medicamento. No âmbito do processo de fabrico, a entidade coordenadora do licenciamento industrial é o Ministério da Economia e do Emprego. Em Portugal é a Infarmed que realiza as actividades de supervisão e fiscalização, verificando a implementação dos sistemas de boas práticas de acordo com as normas nacionais e procedimentos internacionais estabelecidos pela Comissão Europeia e pela Agência Europeia do Medicamento. As boas práticas de fabricação determinam que processos de fabricação devem ser definidos e monitorizados sistematicamente e devem ser efectuadas, frequentemente, qualificações e validações consideradas necessárias.

Além disso para garantir as boas práticas de fabricação os funcionários devem estar treinados para desempenharem correctamente os procedimentos, as instalações, equipamentos, materiais, recipientes e rótulos terão de ser os mais adequados, devem ser feitos registos de todas as etapas de produção, o armazenamento e distribuição devem ser adequados para não colocar em risco a sua qualidade, as reclamações sobre os produtos devem ser registadas e examinadas, entre muitas outras.

A grande vantagem destas práticas de fabricação é sobretudo assegurar os requisitos mínimos de higiene e organização, controlar a qualidade dos produtos durante todas as fases de produção, assegurar que contém a infra-estrutura necessária para o fabrico do medicamento, reduzir desperdícios e trabalhar com segurança.

- **Distribuição**

Depois do fabrico do medicamento procede-se à distribuição do mesmo. A distribuição tem como principais objetivos assegurar a validação da prescrição, o cumprimento integral do plano terapêutico, a diminuição dos erros associados à dispensa e administração, uma melhor adesão do doente à terapêutica e o cumprimento dos procedimentos e normativos legais a recursos humanos, instalações e equipamentos, processos organizacionais e técnicos. Outra das grandes vantagens é o facto de assegurar uma utilização segura, racional e eficaz do medicamento realizado quer no internamento quer no regime de ambulatório ^[3].

Em Portugal as atividades de abastecimento, posse, armazenagem ou fornecimento de medicamentos destinados à transformação, revenda ou utilização em serviços médicos, unidades de saúde e farmácias, excluindo o fornecimento ao público, depende sempre de autorização do Infarmed. Consumada a sua distribuição o medicamento passa para o processo de prescrição e dispensa.

- **Prescrição e Dispensa**

A prescrição e dispensa de medicamentos feita com qualidade são fundamentais para que o tratamento do paciente alcance bons resultados. De acordo com a Administração Central do Sistema de Saúde (ACSS), a dispensa é o ato de um farmacêutico de proporcionar um ou mais medicamentos prescritos a um paciente, geralmente como resposta à apresentação de uma receita elaborada por um médico ou profissional autorizado. Antes da dispensa, o farmacêutico informa e orienta o paciente sobre o uso adequado do medicamento.

Os medicamentos para venda podem ser classificados, como: sujeitos a receita médica, medicamentos de receita médica especial (ex. estupefacientes), medicamentos de receita médica restrita (ex. uso exclusivo hospitalar ou em alguns casos de ambulatório) ou não sujeitos a receita médica. No entanto como em todos os processos existem regras e avisos que devem ser seguidos tais como:

- Os médicos devem prescrever medicamentos, dispositivos e outros tratamentos baseados unicamente em considerações médicas e necessidade do paciente e com expectativas razoáveis sobre a eficácia do medicamento, dispositivo ou outro tratamento para o paciente em particular;
- Médicos não podem aceitar qualquer tipo de pagamento ou compensação de uma empresa farmacêutica para prescrever os seus produtos. Além disso, os médicos não devem ser influenciados na prescrição de medicamentos por um interesse financeiro direto ou indireto de uma empresa ou de outro fornecedor;
- Os médicos podem possuir ou operar uma farmácia, mas geralmente não podem enviar os seus pacientes para ela, exceto se tal ação beneficie principalmente o paciente;
- Os pacientes têm o direito de ter acesso à informação contida nos seus registos médicos individuais. Uma vez que a prescrição é parte do registo do paciente, ele tem o direito a uma cópia da prescrição do médico dos medicamentos ou dispositivos. Por isso, os médicos não devem desencorajar os pacientes de solicitar uma cópia escrita da receita médica ^[6].

- **Utilização**

Como foi dito anteriormente os doentes têm o dever de procurar informação e o direito a ser informados quanto às suas próprias responsabilidades para um uso correto e adequado dos medicamentos. Os profissionais de saúde, médicos e farmacêuticos, que têm um papel fundamental na promoção da utilização racional dos medicamentos, deverão prestar todos os esclarecimentos aos doentes, sempre que necessário. Mesmo assim, os pacientes antes de utilizar qualquer medicamento deverão procurar conhecer os medicamentos que toma, através da leitura do folheto informativo (bula) que acompanha os medicamentos e dos esclarecimentos do médico ou farmacêutico e informar sempre os mesmos dos medicamentos que toma, se está grávida, pretende engravidar ou está a amamentar, outras doenças, etc. Além disso é bastante aconselhável tomar os medicamentos tal como lhe foram indicados, em termos de horários, dose, duração do tratamento e do que fazer caso se esqueça de

uma toma bem como manter os medicamentos na embalagem de origem, seguindo as instruções de conservação. Por fim é recomendável verificar sempre o prazo de validade.

1.2. Furazolidona (FZD)

O Giarlam é um dos medicamentos que está sujeito aos processos de qualidade, segurança e eficiência, isto é, percorre também o ciclo dos medicamentos explicado anteriormente. A substância ativa deste medicamento é designada por Furazolidona (*figura 1.2*). Este fármaco de administração oral é um antiprotozoário, giardicida e antibacteriano, com efeito microbicida. É usado no tratamento de diarreia provocada por bactérias. Também pode ser útil no tratamento da febre tifoide, infeções da cólera e salmonela ^[57].

Phillips and Hailey (1986) ^[43] e Brander *et al.* (1971) ^[9] referem que a furazolidona é um medicamento com um espectro antibacteriano relativamente amplo, frequentemente usado para tratar certas doenças bacterianas e protozoárias no homem e também nos animais. Já Mustafa *et al.* (1986) ^[38] e Tatsumi *et al.* (1981) ^[54] informaram que a furazolidona em alguns animais pode levar a mudanças em alguns componentes do plasma e a alterações histopatológicas no fígado e nos rins. Nas aves de capoeira, a droga foi utilizada para inibir a atividade da enzima monoaminoxidase (MAO).

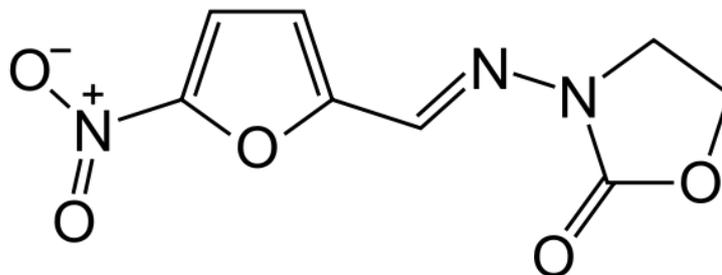


Figura 1.2 – Formula química da Furazolidona ^[59]

O modo de uso deste medicamento é por via oral, normalmente quatro vezes por dia e pode ser tomado com alimentos se ocorrer indisposição gástrica. Para melhores resultados, é aconselhável tomar cada dose em intervalos constantes. Isso irá garantir um nível contínuo de medicamento no sangue. É imperativo tomar este medicamento durante todo o tempo prescrito pois parando o tratamento cedo demais pode fazer com que a infeção volte a manifestar-se.

Mas como todos os medicamentos, a furazolidona também tem efeitos colaterais tais como dor de cabeça, dores de estômago, náuseas, vômitos, tonturas ou fraqueza. Isto pode ocorrer nos primeiros dias quando o corpo ainda se está a ajustar à medicação. Em casos particulares e raros este medicamento pode desenvolver febre, comichão, dores musculares, dificuldade para respirar e a urina pode-se transformar em cor avermelhada. Nestes casos é aconselhável ao paciente informar o médico ou farmacêutico. O paciente antes de utilizar este medicamento terá que verificar se não contém doenças de sangue ou alergias (especialmente alergias a medicamentos). Além disso, terá que evitar a ingestão de álcool durante o tratamento e durante 4 dias após o término deste medicamento pois, caso contrário, poderá causar uma reação que causa vermelhão, febre, aperto no peito e dificuldades respiratórias. Se esta medicação causar tonturas evitar realizar tarefas que exijam atenção. As crianças com menos de um mês de idade e mulheres grávidas não devem receber este medicamento. Em relação às mulheres grávidas a explicação é porque ainda não se tem a certeza se este medicamento aparece no leite materno ^[35] ^[53].

A Furadolizona (FDZ) não deve ser utilizada com os seguintes medicamentos: apraclonidine, brimonidina, betanidina, bupropion, buspirona, carbamazepina, dextrometorfano, a entacapona, indoramina, meperidina, papaverina, sibutramina, antidepressivos ISRS (por exemplo, fluoxetina, citalopram), simpatomiméticos, tolcapone, antidepressivos tricíclicos, "triptanos" (por exemplo, sumatriptano, zolmitriptan) pois podem ocorrer interações muito graves colocando em risco a saúde do paciente ^[39].

É possível que ao consumir alimentos que contêm tiramina durante o tratamento com a FDZ possa causar dor de cabeça e/ou aumento da pressão arterial o que pode levar a uma emergência médica. Alguns alimentos que contêm tiramina

incluem carne ou peixe (fígado, salsicha seca), produtos lácteos (iogurte, leite creme), bebidas (cerveja, café), frutas e vegetais (abacaxi, bananas, figos, favas), molhos de soja e grandes quantidades de chocolate. A tiramina é uma substância inofensiva que existe em todos os alimentos. Pode ser encontrada em maiores quantidades em alimentos que contenham bastante fermento ^[40] [7].

Neste trabalho desenvolveu-se um sensor que fosse capaz de detetar a furazolidona. Pelo que foi descrito anteriormente, há uma necessidade crescente de desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de fármacos, seja para avaliação dos ensaios clínicos, para o estudo dos mecanismos de ação, para controlo da qualidade do fármaco e processo de fabrico. Além disso, uma vez que os fármacos excretados podem ir parar ao meio ambiente, há também necessidade de se avaliar a contaminação ambiental por estes agentes. Outro aspeto fundamental está relacionado com o uso descontrolado de fármacos em veterinária, podendo levar à contaminação de alimentos que ingerimos (carne, leite, peixe de aquacultura).

Alguns métodos têm sido propostos na deteção de furazolidona em diferentes amostras, baseados essencialmente em espectrofotometria ^[2] [16] [17] [45] [61] e HPLC ^[34] [23]. Recentemente métodos de deteção eletroquímica foram também propostos ^[14] [29] [41]. Os métodos mais usados e eficientes são os métodos por HPLC. Contudo estes apresentam maior custo por análise, equipamento mais caro e na maior parte das vezes tratamentos de amostras demorados. Os métodos de voltametria ^[14] [41] propostos para a deteção de FDZ são mais simples e apresentam mais baixos limites de deteção. Contudo não são seletivos. Até ao momento não temos conhecimento de publicações com elétrodos seletivos para deteção de FDZ.

1.3. Polímeros molecularmente impressos

Para a construção do sensor eletroquímico seletivo para a Furazolidona, houve também a necessidade de realizar uma síntese de polímeros molecularmente impressos, pelo método químico. Polímeros molecularmente impressos (MIP's) afiguram-se como materiais promissores a serem utilizados como ferramentas seletivas em química analítica devido à boa seletividade apresentada. A seletividade dos MIP's está diretamente relacionada com o reconhecimento pelo polímero de uma molécula de interesse (template), a qual foi designada previamente como molde no processo da sua síntese. MIP's apresentam como vantagens a fácil preparação, o baixo custo, a possibilidade de síntese em ambientes adversos, a resistência química na presença de ácidos, bases, iões metálicos, solventes orgânicos e contém resistência física a altas temperaturas e pressões ^[50] ^[30].

Rachel Walsh (2010) ^[62] refere que a tecnologia de impressão molecular que permite que locais de reconhecimento seletivo possam ser criados em polímeros sintéticos. Isto é possível pela formação de uma matriz reticulada polimérica entre monómeros altamente funcionais e de um composto alvo. Yi Fu (2003) ^[15] refere que os MIP's têm sido amplamente usados numa série de aplicações que necessitam de ligações seletivas, tais como absorventes de HPLC em fase sólida para a separação e análise de misturas racémicas.

Blanka Tóth (2010) ^[55] refere que os MIP's são uma nova tecnologia para a criação de locais de ligação seletivos numa matriz polimérica por polimerização, na presença de um molde. O molde pode ser removido a partir do polímero e o polímero resultante juntamente com a impressão molecular é capaz de ligar seletivamente o composto alvo a partir de uma matriz da amostra. Ao mesmo tempo, a impressão é um método de síntese simples e eficiente e os MIP's tem alta estabilidade física e química.

Na revisão das origens históricas da impressão molecular como uma técnica, é de salientar que o MIP foi introduzido pela primeira vez em 1930 por um químico soviético chamado Polykov que realizou uma série de investigações em sílica para a utilização em cromatografia. Observou-se que, quando os géis de sílica foram

preparados na presença de um solvente, o aditivo resultante de sílica demonstrou a capacidade de ligação preferencial para esse solvente. Foi a primeira vez que as experiências deste tipo foram acompanhadas por explicações desta natureza. O mecanismo proposto por Polykov foi largamente ignorado pela comunidade científica.

Em 1949, um estudo realizado por um estudante de Linus Pauling chamado Frank Dickey envolveu o desenvolvimento da impressão molecular em matrizes de sílica na presença de corantes. Dickey observou que após a remoção do corante "modelação" a sílica ligaria o mesmo corante de preferência aos outros. O estudo de Dickey pode ser considerado como a origem dos primeiros materiais impressos.

A abordagem de Dickey para introduzir o modelo na mistura de pré-polymerização de sódio produziu uma influência mais definida na estrutura da sílica, enquanto Polykov apresenta o modelo depois de a estrutura de sílica ter sido formada. O trabalho de Dickey é semelhante às metodologias atuais, por isso esse método tornou-se o mais amplamente utilizado em estudos subsequentes ^[22] ^[56].

A impressão em sílica continuou durante os anos 1950 e 1960, mas o número de publicações da área manteve-se baixa. Trabalhou-se na área envolvida tentando usar materiais impressos para separações práticas, tais como fases sólidas em cromatografia e cromatografia em camadas delgadas. As razões para o interesse limitado foram relacionadas a limitações na estabilidade e reprodutibilidade dos materiais de sílica impressos. No entanto, ocorreu o ressurgimento de sílica através da pesquisa do MIP. Pinel *et al.* (1997) ^[44] examinaram a impressão de gel de sílica e mostrou que especificidade da região para cresóis foi impressa com êxito utilizando o-cresol como molde. Hunnius *et al.* (1999) ^[24] prepararam sílicas porosas através de um processo sol-gel, que foram desenvolvidas para a criação de sítios de adsorção seletiva por impressão molecular. Dependendo das condições de preparação, sílicas microporosas mostram seletividade de adsorção surpreendente. Estas seletividades não estão relacionadas com os efeitos de impressão, mas deve ser atribuída às alterações imprevisíveis na polaridade da superfície dos materiais porosos finais. Um estudo publicado por T.R. Ling (2005) ^[32] mostrou o reconhecimento de catecolamina com um estampado de gel de sílica-alumina molecular. T. Shiomi *et al.* (2005) ^[48]

testou uma nova técnica de impressão molecular para sintetizar proteínas de sílica impressas usando hemoglobina o modelo covalente imobilizado para aplicação biológica.

A introdução de impressão molecular aplicada a polímeros orgânicos foi relatada pela primeira vez por um grupo liderado por Gunter Wulff no início de 1970. Desde então, a impressão molecular tem avançado significativamente e uma série de empresas já vendem impressões sob medida.

Uma representação esquemática para a síntese de um polímero molecularmente impresso (MIP) é mostrada na *figura 1.3*. Na primeira figura um complexo de pré-polimerização é formado entre uma molécula modelo (verde) e um ou mais monómeros funcionais (azul, vermelho e amarelo) por quaisquer interações não-covalente, covalente e/ou coordenação metal-ião. No segundo esquema da figura a polimerização ocorre em seguida sendo necessária uma grande quantidade de agente de ligação cruzado (crosslinking agent) para produzir o MIP (preto). No último esquema a remoção da molécula molde (azul) é realizada através da lavagem e/ou extração. Este passo irá deixar locais de reconhecimento específicos que são complementares à molécula molde em termos de tamanho, forma e orientação de funcionalidade química, permitindo assim o reconhecimento subsequente do molde durante o processo de ligação ^[62].

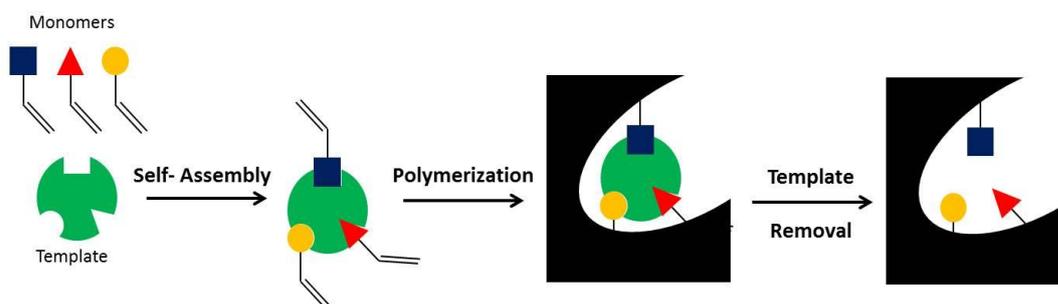


Figura 1.3 – Representação do MIP ^[62]

Existem essencialmente dois principais tipos de MIP's: os covalentes e os não-covalentes. Na abordagem covalente a impressão molecular promove a distribuição de locais de ligação mais homogénea e com pontos de ligação em grande parte idênticos.

As constantes de ligação para a molécula molde são elevados, uma vez que a interação entre o molde e o monómero funcional é baseada em interações covalentes formada entre o polímero e a molécula molde durante a polimerização. O passo da síntese química é necessário para ligar o molde ao monómero funcional através de vários tipos de ligação, formados por grupos funcionais tais como bases de Schiff, os boratos, cetais, amidas carboxílicos e ésteres. No entanto, não menosprezando as elevadas afinidades dos materiais poliméricos, a gama dos grupos funcionais que podem ser alvo é restrito e a remoção das moléculas do molde é tedioso (clivagem química) e limita a aplicação dos MIP's covalentemente preparados. Além disso, a lenta ligação cinética restringe a aplicação analítica dos MIP's, se a ligação é baseada em ligações covalentes reversíveis ^[47] ^[52].

Os polímeros obtidos na impressão molecular não covalente, são baseados em interações não covalentes que se estabelecem na mistura da pré-polimerização. Uma consequência é a necessidade de uma estabilidade suficiente do complexo para permitir a formação de pontos de ligação durante o processo de polimerização. Em contraste com a impressão covalente, a impressão não covalente é caracterizada por uma distribuição de locais de ligação mais heterogénea. Devido a isto a sobrecarga de amostra pode ocorrer devido à saturação rápida como consequência da baixa quantidade de locais de ligação de alta afinidade, o que resulta numa diminuição significativa da performance global do polímero. No entanto, os procedimentos de preparação simples, a ampla gama de compostos de impressão e ligações polímero-moléculas reversíveis com base em interações não-covalentes, tornam o método não-covalente o método mais geral para a preparação do MIP ^[32]. A *figura 1.4* mostra a diferente entre uma ligação covalente e uma não-covalente ^[36].

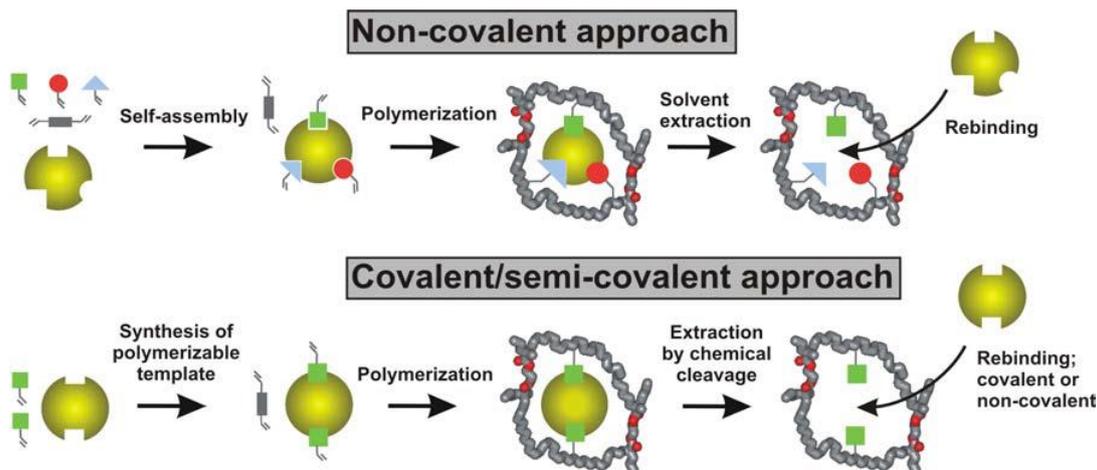


Figura 1.4 - Método covalente VS Método não-covalente ^[36]

1.4. Técnicas voltamétricas

Voltametria é o nome de um conjunto de técnicas eletroquímicas, onde a corrente é estudada como uma resposta ao potencial. Estas técnicas têm uma ampla gama de aplicabilidade na química moderna, podendo fornecer informação sobre a termodinâmica e cinética das reações químicas. Pode ser utilizada para identificar e quantificar diferentes espécies em solução ^[33].

O coração de um sistema eletroquímico é o potencióstato. Um potencióstato é um dispositivo que aplica um potencial (ou tensão) entre um par de eléctrodos e mede simultaneamente a corrente que flui através de uma solução de uma substância a analisar. Os eléctrodos são chamados o eléctrodo de trabalho e o auxiliar (ou contra) eléctrodo. O tipo mais comum de potencióstato incorpora um terceiro eléctrodo, denominado eléctrodo de referência. Nenhuma corrente flui através do eléctrodo de referência, ele simplesmente fornece um potencial que pode ser definido como “zero”. Como mostrado na *figura 1.5*, o eléctrodo referência e os eléctrodos auxiliares estão ligados por um sistema eletrónico (identificado como “V”), que impõem uma tensão no eléctrodo auxiliar. Uma vez que o eléctrodo referência é definido como “zero”, o eléctrodo de trabalho tem de assumir uma tensão igual mas oposta do auxiliar. A corrente que flui através do eléctrodo de trabalho pode ser medido por um sistema separado denominado “A”. Esta forma indireta de fazer as coisas permite um controlo

muito eficaz do potencial do eléctrodo de trabalho e simplifica muito o sistema electrónico de todo o potencióstato ^{[19] [46]}.

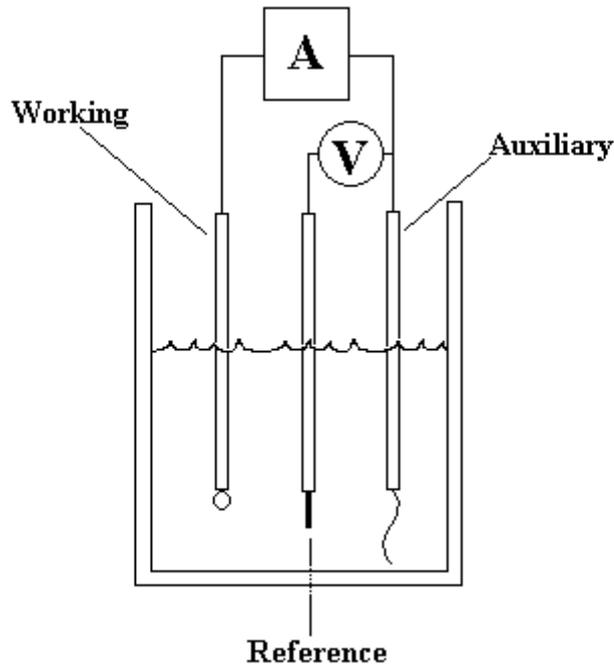


Figura 1.5 – Potencióstato ^[60]

Para se fazer uma medição voltamétrica existem várias técnicas de variação do potencial de modo e medir a intensidade de corrente obtida. Uma das técnicas voltamétricas é a chamada voltametria de varrimento linear (LSV). Esta técnica (*figura 1.6*) é um termo geral aplicado a qualquer método voltamétrico no qual o potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho varie linearmente com o tempo. Estes métodos incluiriam polarografia e voltametria cíclica (CV). O declive desta rampa tem como unidades volts por unidade de tempo, e é geralmente chamado de velocidade de varrimento da experiência ^{[12] [21]}.

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

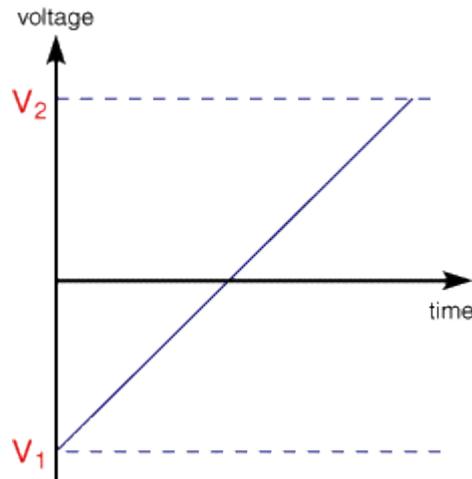


Figura 1.6 - Voltametria de varrimento linear ^[58]

A polarografia consiste numa técnica analítica eletroquímica para a determinação qualitativa e quantitativa de numerosas substâncias, especialmente vestígios de metais. Este método foi inventado em 1925 pelo químico checo Jaroslav Heyrovsky ^[20].

Nesta técnica usa-se um eléctrodo de mercúrio como cátodo juntamente com um ânodo não polarizável e uma solução diluída da amostra em estudo. O eléctrodo de mercúrio é formado por um tubo estreito através do qual se processa a passagem de mercúrio muito lentamente para a solução de maneira a que se formem pequenas gotas no extremo do tubo que se dissolvem ^[20].

Aplica-se uma diferença de potencial que vai aumentando lentamente. Com cada gota que cai reduzem-se as diferentes classes de iões consoante se alcança o correspondente potencial de dissociação (por ordem dos seus potenciais eléctrodos). A pequena intensidade de corrente assim gerada é registada.

A representação gráfica da variação da intensidade da corrente em função do potencial permite a obtenção de uma curva denominada polarograma (*figura 1.7*).

Esta técnica é muito útil na deteção de pequenas quantidades de metais e na investigação de complexos solvatados.

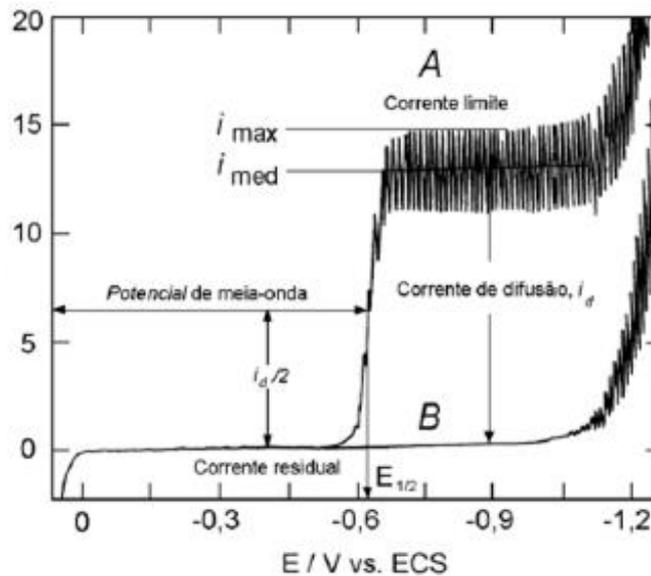


Figura 1.7 - Polarogramas de corrente contínua (CC) ^[13]

A intensidade de corrente do processo de oxidação/redução em estudo é dada pela diferença entre a intensidade máxima e a corrente de difusão.

A variação do potencial ao longo do tempo pode também ser utilizada. Estes métodos são chamados de "métodos pulsados", e estão em uso comum hoje em dia.

Numa amostragem, o composto A está sempre a ser reduzido para o composto B, apesar da medição da corrente acontecer apenas em um único instante no tempo de vida de cada gota. Um sinal mais elevado pode ser obtido se o potencial for aplicado apenas brevemente antes de cada medição de corrente. Este método é chamado Polarografia de pulso normal (NPP). NPP (figura 1.8) é um pouco mais sensível do que a amostragem de CC e polarografia regular. Novamente, os dados obtidos têm a mesma forma que uma LSV regular ^{[1][11]}.

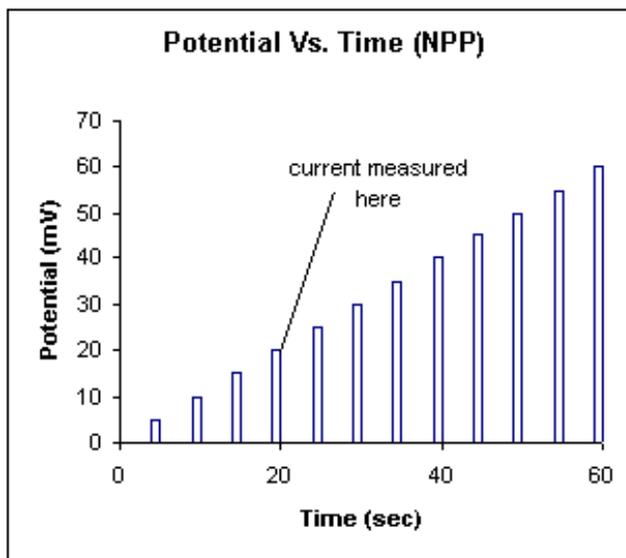


Figura 1.8 - Polarografia de impulso normal ^[53]

Uma modificação do NPP é Polarografia de pulso diferencial (DPP). Neste método (*figura 1.9*), a corrente é medida duas vezes durante o tempo de vida de cada gota, e a diferença de corrente é representada graficamente. DPP tem a vantagem de ter limites de deteção sensíveis. Tradicionalmente, os metais na gama ppm podem ser determinados com DPP.

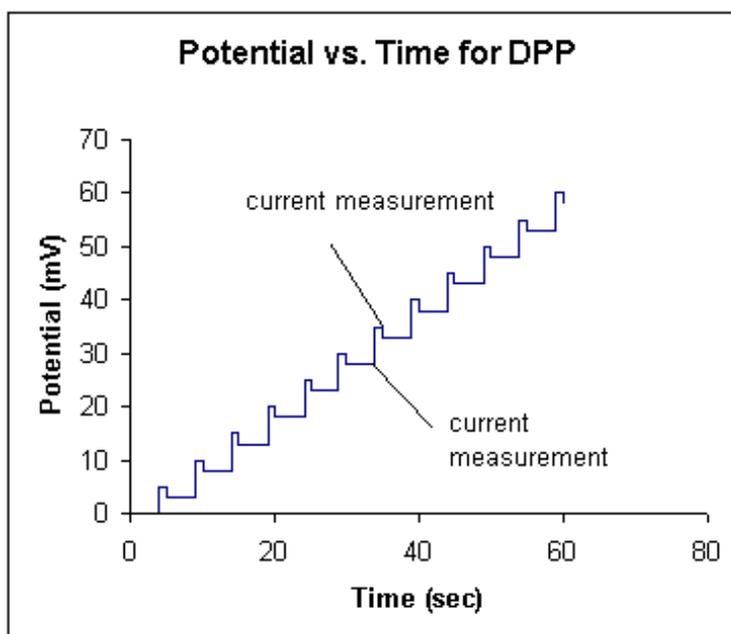


Figura 1.9 - Polarografia de pulso diferencial ^[60]

Outra técnica voltamétrica é designada por voltametria de onda quadrada (SWV). Esta técnica utiliza uma forma de onda de potencial como mostrado abaixo (*figura 1.10*). A vantagem da voltametria de onda quadrada é que toda a análise pode ser realizada em uma única gota de mercúrio em cerca de 10 segundos, em oposição a cerca de 5 minutos para que as técnicas descritas anteriormente. SWV economiza tempo, reduz a quantidade de mercúrio por análise até um fator de 100 [8]. Para cada pulso é usado um potencial de oxidação seguido de um potencial de redução. Para reações de oxidação/redução reversíveis a intensidade de corrente medida em cada instante corresponde à soma da intensidade de corrente de oxidação com a intensidade de corrente de redução, facto que permite aumentos significativos de sensibilidade [8].

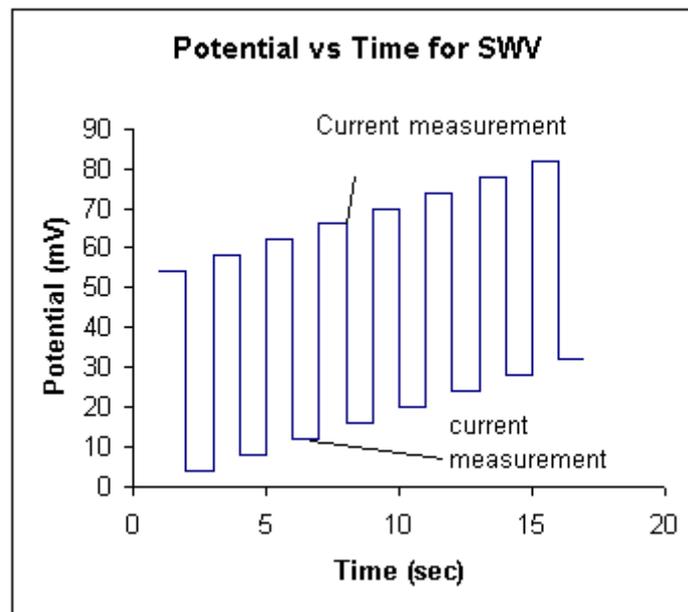


Figura 1.10 - Voltametria de onda quadrada [60]

Os dados para SWV aparecem da mesma forma como para DPP, embora a altura e largura da onda depende da combinação exata dos parâmetros experimentais (isto é, taxa de varrimento e da altura de impulso), ao contrário do DPP. Como acontece na técnica DPP, a corrente no início de um impulso é subtraída pela corrente no final do impulso.

A voltametria cíclica (CV) é mais uma das técnicas volumétricas que podem ser utilizadas. Nesta, a direção do potencial é invertida relativamente ao final do primeiro varrimento. Então, geralmente a curva tem a forma representada na *figura 1.11*.

Este processo traz a vantagem de que o produto da reação redox que ocorreu na primeira etapa do varrimento (ida) poder ser avaliado novamente no varrimento inverso (volta).

A voltametria cíclica apesar de não permitir a deteção de baixíssimas correntes é utilizada para avaliar sistemas desconhecidos. É por isso uma técnica que permite recolher informação essencialmente qualitativa.

As vantagens desta técnica passa por conseguir caracterizar o comportamento redox de compostos, determinar processos químicos que precedem ou sucedam reações eletroquímicas, avaliar a cinética das transferências eletrónicas e também por conseguir obter com sucesso uma análise quantitativa ^{[8] [21]}.

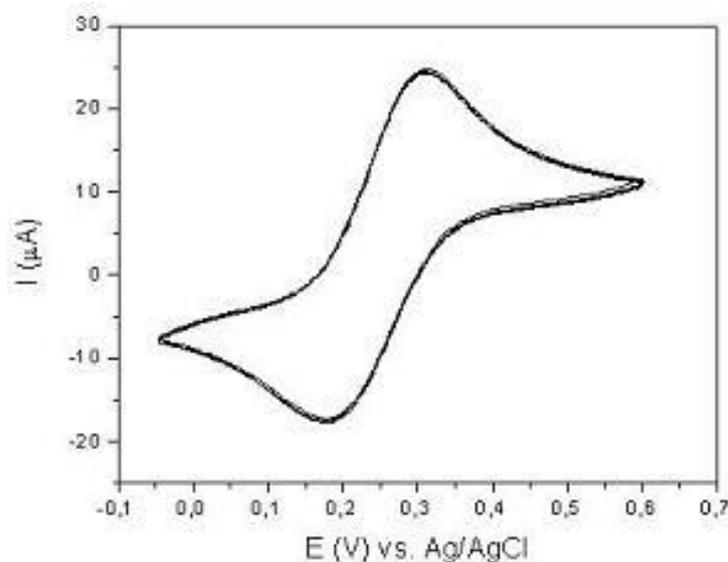


Figura 1.11 – Voltametria Cíclica ^[27]

A última técnica voltamétrica referenciada neste trabalho é a voltametria hidrodinâmica ou amperometria. Esta técnica refere-se à medição da corrente quando esta sofre um potencial constante. Nestas circunstâncias, o valor da corrente elétrica é determinada pela concentração da amostra analisada.

Estas medições podem ser usadas para o acompanhamento da variação da concentração de um dado analito durante a titulação e para a fixação do ponto final.

A corrente da difusão é proporcional à concentração do material eletroativo presente na solução. Quando se remove o material eletroativo através da interação com um reagente, a corrente de difusão diminuirá. Este é o princípio fundamental das titulações amperométricas. A titulação pode ser feita com rapidez, pois o ponto final é encontrado graficamente ^[60].

Vários tipos de eléctrodos podem ser usados como eléctrodo de trabalho, tais como, eléctrodo de mercúrio, carbono vítreo, pasta de carbono, ouro, platina, etc. Neste trabalho usou-se um eléctrodo de pasta de carbono construído no laboratório.

1.4.1. Eléctrodo de pasta de carbono

A primeira proposta para um desenvolvimento de um eléctrodo de pasta de carbono (*figura 1.12*) foi atribuída a Adams ^[51] em 1958, quando este físico tentava preparar um eléctrodo de grafite para ser utilizado em potenciais mais positivos, nos quais o mercúrio metálico apresenta oxidação. Estes eléctrodos são feitos pela mistura física de pó de grafite e um líquido para produzir a pasta.

Pelo facto dos eléctrodos de pasta de carbono apresentarem contacto com um electrólito numa célula eletroquímica, deve ter baixa tensão no meio de trabalho e uma alta pureza para evitar qualquer reação eletroativa indesejada. Em soluções não aquosas os eléctrodos de pasta de carbono tendem a desintegrar-se por a dissolução do líquido impregnante. Este problema é resolvido pela adição de um agente de superfície ativa quando a grafite é homogeneizado com solvente não aquoso e um líquido impregnante. ^[10]

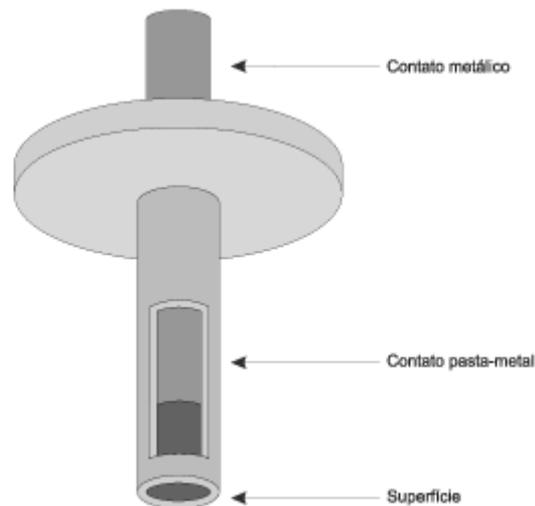


Figura 1.12 – Eléctrodo de pasta de carbono ^[10]

A primeira montagem de um eléctrodo de pasta de carbono, ou seja, um suporte de eléctrodo (corpo) preenchido com a pasta de carbono foi utilizado nos estudos pioneiros de Adams como é possível ser verificado no seu relatório inicial, primeira revisão ^[4] assim como na sua monografia conhecida ^[5]. A construção adequada havia sido baseada numa curta vara Teflon, com um poço perfurado e uma Pt-fio como contacto eléctrico.

Até agora, o projeto semelhante ao eléctrodo de pasta de carbono desenvolvido pelo Adams ainda é a construção mais utilizada. As suas principais vantagens são a simplicidade e a variabilidade de tamanho, contudo a renovação de pasta de carbono ou a troca total é menos conveniente.

O segundo grupo mais utilizado dos utilizadores de pasta de carbono são, os eléctrodos de piston-driven, em primeiro lugar propostos por Monien et al. ^[37] e inovado por Lindquist ^[31]. Este eléctrodo oferece uma renovação confortável de pasta de carbono caso uma troca frequente da camada superficial seja necessário. Além disso, este tipo de eléctrodo de pasta de carbono pode ser concebido de diversas variantes e tamanhos, como é mostrado pela *figura 1.13*.

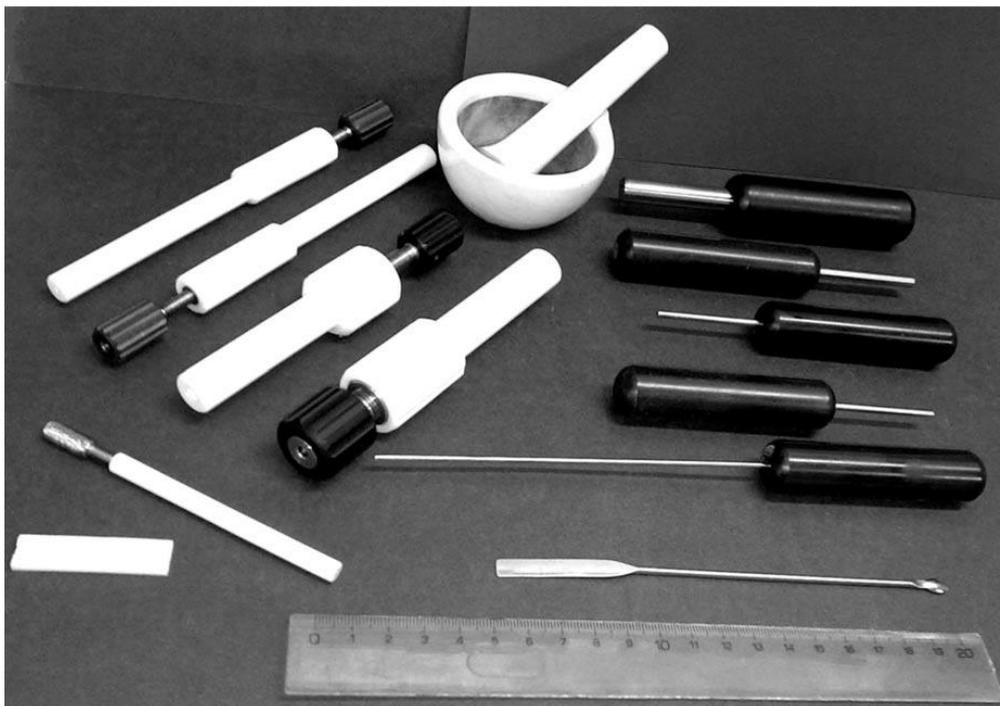


Figura 1.13 – Eléctrodos de pasta de carbono Piston-driven ^[51]

Além dos dois tipos de eléctrodos de pasta de carbono descritos em cima, há uma série de outros projetos, como por exemplo um conjunto de tubos de vidro com terminações em forma de sino, permitindo uma maior capacidade de enchimento de pasta de carbono ^[28]; Eléctrodos disco-anel ^[18], com duas superfícies independentemente polarizáveis especialmente para estudos eletroquímicos; Eléctrodos de corpo Utube cheio de mercúrio líquido e uma pequena porção de pasta de carbono no final transformada reversamente contendo a superfície exposta para cima; Um eléctrodo com uma configuração planar construída permitindo assim que a pasta de carbono seja rapidamente reabastecida ^[51] ou um projeto semelhante com a unidade de aquecimento eléctrico integrado no corpo.

Os eléctrodos de pasta de carbono apresentam um processo de preparação simples e rápido (facilmente preparado em qualquer laboratório). Uma grande vantagem deste tipo de eléctrodo é o facto de permitir a renovação da superfície a cada nova medida, evitando procedimentos de limpeza morosos (como nos eléctrodos de carbono vítreo e de ouro). Além disso facilmente podem ser adicionados modificadores que permitam aumentar a sensibilidade e/ou seletividade de acordo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

com as moléculas em análise. Exemplos são a modificação com nanomateriais ou material biológico. Recentemente têm sido frequente a incorporação de polímeros molecularmente impressos ^[49]. Uma das maiores limitações é a obtenção de limites de deteção mais altos.

2. Parte experimental

2.1. Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes foram utilizados, tal como foram recebidos, sem qualquer purificação adicional ao longo de todo o trabalho experimental: Etanol (C_2H_6O , 46,06 g/mol, Panreac), Parafina (C_nH_{2n+2} ($n > 20$), Uvasol, Merck), Gráfito (Ultra "F" purity Carbone Lorraine), Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2 , 34,01475 g/mol, 30% w/v, Panreac), Hidróxido de Sódio ($\geq 98\%$, NaOH, 39,997 g/mol, Panreac), Azoto (5.0, N, Sysadvance), Ácido clorídrico (37%, HCl, 36,46g/mol), Ureia ($(NH_2)_2CO$, 60.07g/mol), Glucose ($C_6H_{12}O_6$, 180,16g/mol), Furazolidona ($C_8H_7N_3O_5$, 225,16g/mol), Ácido ascórbico (Merk, 99,7%, $C_6H_8O_6$, 176,09g/mol), Urina, ácido sulfúrico (98%, H_2SO_4 , 98,08 g/mol), hidrogénofosfato de dipotássio ($>98\%$ Riedel-de Haen).

Todas as soluções foram preparadas com água purificada obtida a partir de um sistema de ultrapurificação de água Millipore Simplicity 185 (Resistividade=18,2 M Ω /cm a 25°C).

As soluções padrão de furazolidona foram preparadas diariamente numa concentração 1mM. A partir desta solução foram preparadas, diariamente, soluções de trabalho de concentração pretendida de acordo com a realização do trabalho.

Foram preparadas soluções de ácido sulfúrico de concentração 0,5M usadas para a realização das medições voltamétricas.

Prepararam-se diferentes soluções de tampão fosfato (PBS) 0,1M com diferentes pH's para a realização de estudos de otimização da resposta do sensor.

Para a extração do fármaco do sensor foram preparadas soluções de NaOH 0,1M.

2.2. Equipamento

Todo o trabalho experimental foi efetuado à temperatura ambiente, que é variável, encontrando-se normalmente entre 15º a 18ºC. Para as medições foi utilizado um sistema de três eléctrodos constituído por: um eléctrodo de referência de Ag/AgCl, o eléctrodo de trabalho (3mm), construído numa seringa e constituído por pasta de carbono modifica com polímero e um contra-eléctrodo de grafite.

Todas as medições eletroquímicas foram efetuadas num potenciostato/galvanostato de marca Autolab Metrohm, modelo PGSTAT 12 (*figura 2.1*) com sistema de aquisição e tratamento de dados *General Purpose Electrochemical system for Windows (GPES)* versão 4,9 Eco Chemie B.V.



Figura 2.1 - Fotografia do equipamento Autolab Metrohm, modelo PGSTAT 12.

Para a medição de líquidos utilizou-se material volumétrico de vidro comum de laboratório, bem como, micropipetas (Gilson pipetman) de 100 µL, 200 µL, 1000 µL e 5000 µL; e micropipetas (VWR) de 20 µL, 200 µL e 1000 µL, como se pode visualizar na *figura 2.2*.



X

Figura 2.2 – Fotografia da micropipetas usadas ao longo do trabalho

Todas as pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo), com precisão de 0,00001 g e numa balança analítica (Kern), com precisão de 0,001g.

Para auxiliar a dissolução de algumas soluções utilizou-se o equipamento Ultrassons Sonorex Digital 10P (Bandelin).

O agitador magnético Magnetic Stirrer Modelo NO 690/1 foi utilizado em algumas reacções para se agitar a solução enquanto a reacção decorre de modo a tornar a reacção mais uniforme.

Utilizou-se o equipamento de espectrofotometria UV/Vis de modo a avaliar a eficiência das extracções de furazolidona durante a polimerização, sendo esta efectuada num termobloco a 70 °C. Como as extracções através da espectrofotometria UV/Vis revelou-se ser muito morosos utilizou-se a extração por soxhlet, sendo este um procedimento que mostrou-se ser eficaz e mais rápido.

2.3. Síntese polímero molecularmente impresso

A síntese do polímero molecularmente impresso (MIP) foi efetuada usando 1mM da furazolidona, 20mM de ácido metacrílico, 125mM EGDMA e 6mM de AIBN. Esta mistura foi dissolvida em acetonitrilo. A mistura foi purgada com nitrogénio durante 20 minutos. A polimerização foi efetuada num termobloco a 70 °C durante 24

horas. O polímero final foi triturado e peneirado ($<160\mu\text{m}$) e o fármaco foi removido usando o método de extração por soxhlet com metanol durante 48 horas. A remoção completa do fármaco foi confirmada através da análise da solução de extração por espectrofotometria de ultra-violeta visível. Preparou-se um polímero não-impreso (NIP) do mesmo modo, exceto a não presença do fármaco na polimerização, de forma a realizar ensaios de controlo.

2.4. Preparação do Sensor

A preparação do sensor é constituída por duas fases. A primeira corresponde à realização da pasta de carbono. Esta pasta é constituída por 3 compostos: a grafite, o polímero e a parafina.

O primeiro passo desta preparação consistiu na colocação de 0,055g (55%) de grafite juntamente com 0,010g de polímero (10%) num almofariz e triturar com o pilão até se observar uma pasta homogénea. 0,035g de parafina (35%) foram colocados num frasco a aquecer a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos (*figura 2.3*).



Figura 2.3 – Fotografia da preparação da pasta

Posteriormente a pasta homogénea de grafite e polímero foi adicionada à parafina aquecida e misturadas eficientemente (*figura 2.4*).



Figura 2.4 – Fotografia da pasta de carbono preparada

A segunda fase consistiu na utilização da pasta formada na construção de um eléctrodo. Para isso a pasta foi introduzida numa seringa com um fio condutor de cobre para fazer a ligação eléctrica (*figura 2.5*). Um aspeto importante nesta fase é a compactação da pasta no eléctrodo pois uma boa compactação é uma ação que encaminha diretamente para uma boa resposta do eléctrodo. Para isso comprime-se bem o eléctrodo com uma folha de papel branca até ficar nas condições ideais (*figura 2.6*). É possível a obtenção de uma nova superfície para o eléctrodo removendo a parte superficial da pasta e comprimindo de novo no papel.

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre



Figura 2.5 – Fotografia do eléctrodo fabricado

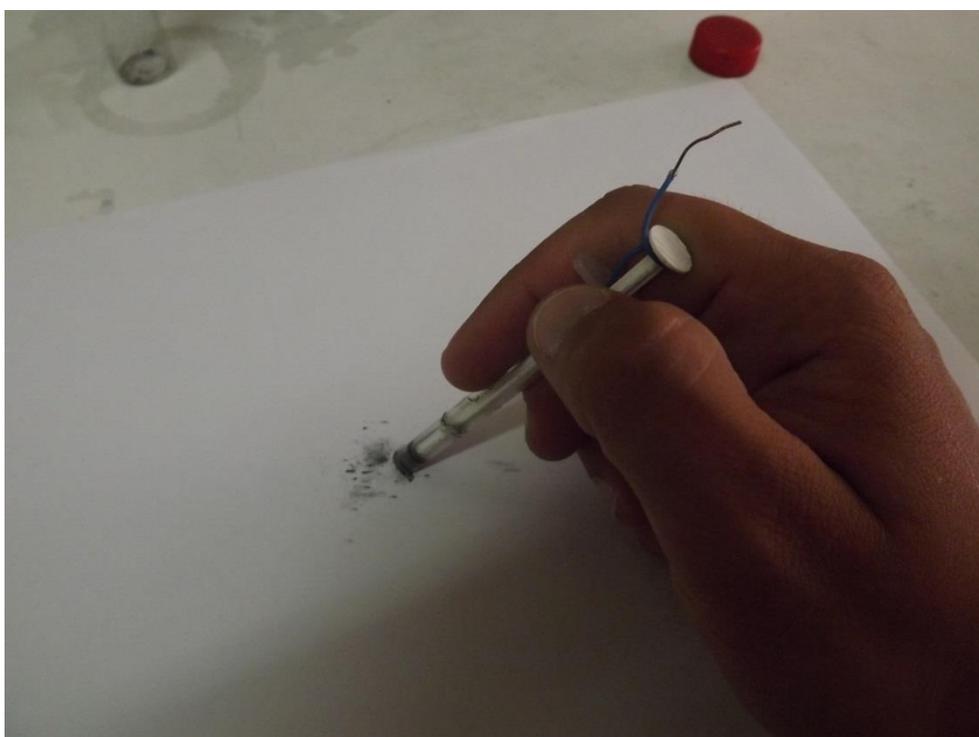


Figura 2.6 – Fotografia do procedimento da compactação da pasta de carbono

2.5. Medições Electroquímicas

Para a realização de análises com o sensor preparado usou-se um procedimento de três etapas: incubação, medição voltamétrica e remoção.

O primeiro passo (incubação) consiste em introduzir o sensor em soluções de concentração conhecidas de furazolidona por períodos de tempo definidos (*figura 2.7*).



Figura 2.7 – Fotografia relativa ao procedimento de incubação

O segundo passo consiste na colocação do sensor na célula electroquímica para a realização das medições voltamétricas (*figura 2.8*).



Figura 2.8 – Fotografia da célula eletroquímica

A solução usada na célula para a realização das medições foi H_2SO_4 0,5M. O varrimento eletroquímico foi efectuado por voltametria de onda quadrada de acordo com as condições representadas na *figura 2.9*.

Page 1		Page 2
Pretreatment		
Purge time (s) :	0	
Conditioning potential (V) :	0	
Duration (s) :	0	
Stirrer off during conditioning :	<input type="checkbox"/>	
Deposition potential (V) :	0	
Duration (s) :	0	
Stirrer off during deposition :	<input type="checkbox"/>	
Equilibration time (s) :	60	
Measurement		
Cell off after measurement :	<input checked="" type="checkbox"/>	
Frequency (8 - 2000 Hz) :	100	
Potentials		
Initial potential (V) :	.2	
End potential (V) :	-5	
Step potential (V) :	.00405	
Amplitude (V) :	.04005	
Standby potential (V) :	0	
Title and subtitle		
<input type="text"/>		
<input type="text"/>		

Figura 2.9 – Condições da voltametria de onda quadrada

O terceiro e último passo passa por, após a conclusão da análise, remover o fármaco (FDZ) contido no eléctrodo colocando o mesmo numa solução de NaOH durante 20 minutos (*figura 2.10*). Quando este passo terminar, o eléctrodo está pronto para voltar ao primeiro passo e desta forma permitir uma nova análise.

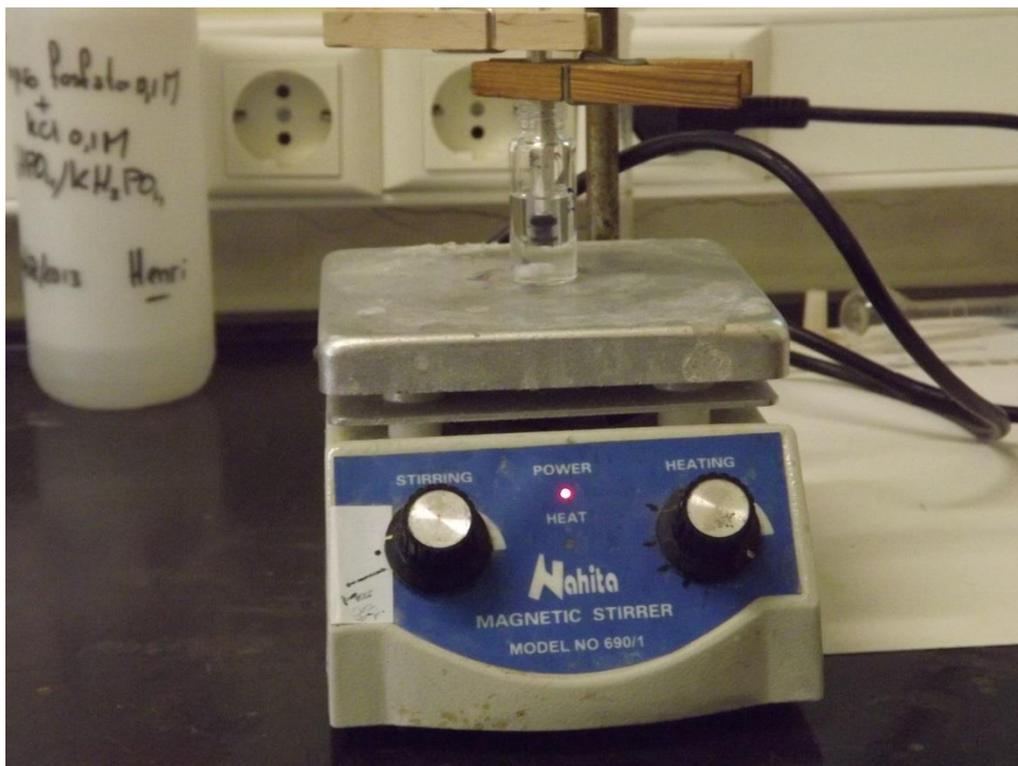


Figura 2.10 – Fotografia do procedimento de remoção em NaOH

2.6. Preparação das amostras

Na parte final do trabalho testou-se a aplicação do sensor na análise de furazolidona em amostras de urina. Estas amostras foram recolhidas de pessoas saudáveis que não tomaram o fármaco. Previamente à realização dos ensaios, as amostras foram centrifugadas para remoção de compostos de elevado peso molecular, como as proteínas. Para a incubação, a urina foi diluída 50% em água ultrapura e o pH da solução foi ajustado para pH 2 com adição de HCl. Foram realizadas adições de furazolidona de concentrações conhecidas.

3. Resultados e discussão

3.1. Preparação do sensor

Inicialmente tentou-se preparar um sensor seletivo para a furazolidona tendo por base a utilização de um eléctrodo vítreo modificado com um polímero impresso. Para isso prepararam-se soluções contendo pirrol (monómero) e furazolidona e procedeu-se à polimerização na superfície do eléctrodo por eletropolimerização. Este procedimento foi seguido pois é simples e de fácil reprodução. O pirrol é um monómero bastante usado neste tipo de procedimentos. A eletropolimerização foi obtida recorrendo ao uso de voltametria cíclica.

Nesta fase foram estudadas várias condições de polimerização, nomeadamente a composição da solução de polimerização, o número de ciclos voltamétricos, a gama de potenciais e procedimentos de remoção da furazolidona do polímero. Foram preparados igualmente eléctrodos não impressos para comparação de resultados.

Na *figura 3.1* estão representados resultados obtidos utilizando sensores preparados de acordo com este procedimento.

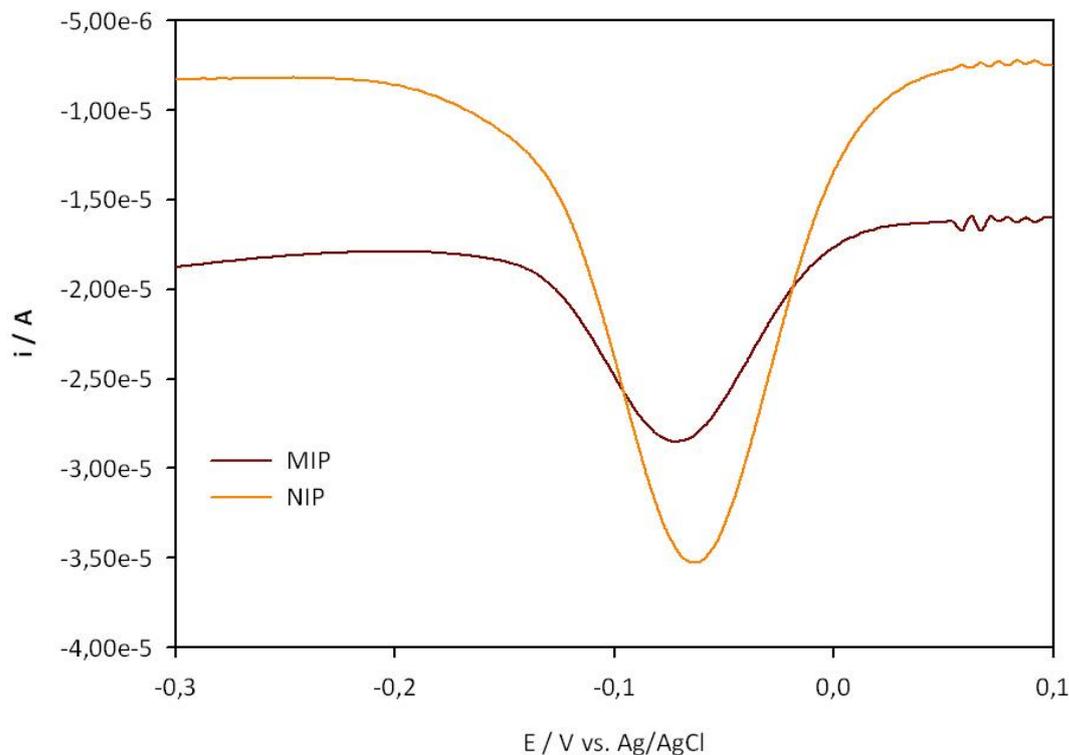


Figura 3.1 – Voltamogramas relativos à análise com sensores MIP e NIP obtidos por eletropolimerização num eléctrodo de pasta de carbono vítreo. Eletrólito de suporte: H_2SO_4 0,5M; Voltametria de onda quadrada 100 Hz; Incubação 10 minutos em FDZ 1mM

Como se pode verificar nos resultados obtidos, o sinal obtido com o NIP é superior ao obtido pelo MIP. Isto verificou-se para todas as condições de polimerização testadas. Deste modo podemos afirmar que não foi possível preparar um sensor com cavidades específicas para a furazolidona usando este procedimento. Uma vez que o sinal do MIP é inferior ao NIP podemos afirmar que provavelmente após polimerização não foi possível remover todas as moléculas de FDZ incorporadas, especialmente aquelas que se encontram em zonas mais profundas. Mesmo tendo sido testadas várias condições de remoção (por solvente e eletroquímica) não foi possível ultrapassar este problema.

Deste modo optou-se por um procedimento de polimerização química usando ácido metacrílico como monómero. Foram usadas condições de polimerização

(temperatura e concentrações) tipicamente descritas na literatura para este procedimento.^[62] O polímero obtido com este procedimento foi usado para preparação de um eléctrodo seletivo de pasta de carbono.

Após a polimerização de acordo com as condições descritas na parte experimental, testou-se a extração da furazolidona por solvente, de modo a garantir a formação de cavidades no polímero. Para isso foram realizadas extrações sucessivas de 20 horas em metanol/ácido acético (80-20). Os extratos obtidos foram analisados por espectrofotometria UV/Vis de modo a avaliar a eficiência das extrações.

Os resultados obtidos estão ilustrados na *figura 3.2*.

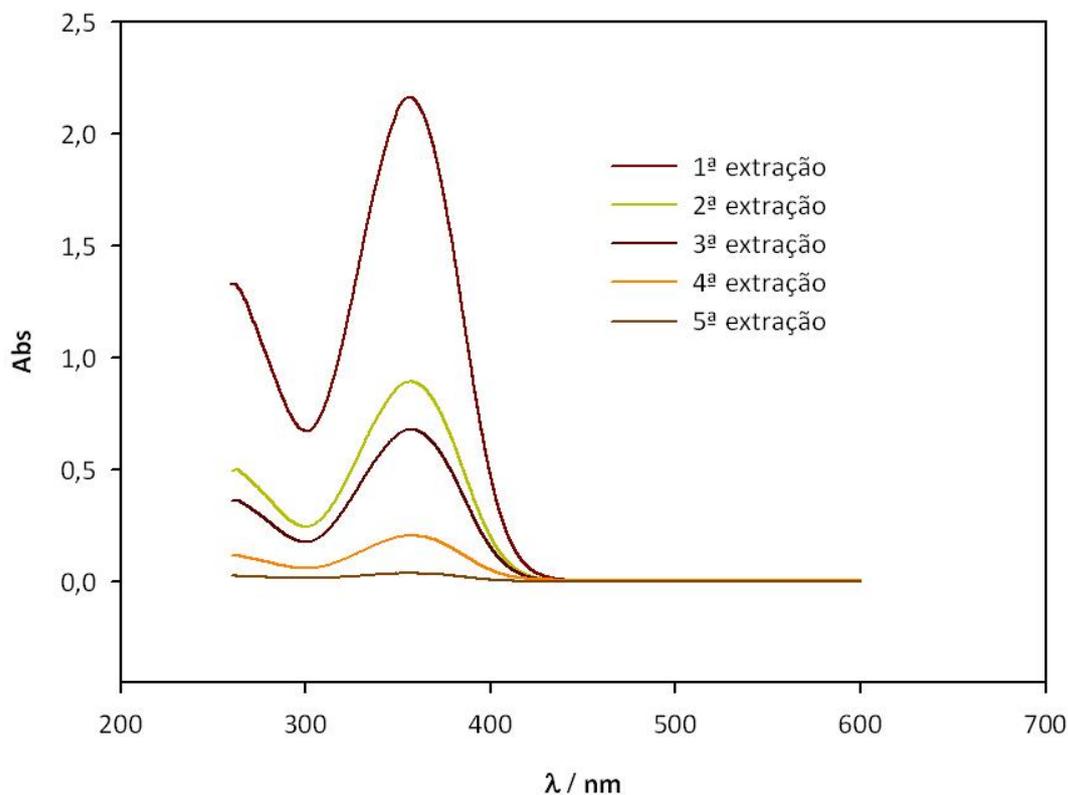


Figura 3.2 – Espectros de absorção das extrações de FDZ do polímero preparado.

Como se pode verificar após a primeira extração observa-se uma banda de absorção relativa à furazolidona. O aparecimento desta banda

revela que a furazolidona foi incorporada eficazmente no polímero durante a polimerização. Além disso, podemos concluir que nestas condições é possível remover a furazolidona do polímero. Deste modo foram realizadas várias extrações até não se verificar nenhuma banda de absorção, facto que indicaria que teríamos extraído o máximo de FDZ. Foram necessárias 100 horas relativas a 5 extrações consecutivas para a remoção completa.

Devido à demora deste tipo de procedimento optou-se por uma extração por soxhlet durante 48 horas usando o mesmo solvente, sendo que este procedimento mostrou-se eficaz.

Deste modo podemos afirmar que foi possível preparar um polímero com cavidades para a furazolidona. De seguida usou-se o polímero para fabricar um sensor.

3.2. Comportamento eletroquímico do sensor

Inicialmente avaliou-se a resposta eletroquímica do elétrodo preparado, nomeadamente o potencial de redução e as condições de análise.

3.2.1. Comparação entre MIP e NIP

Para a avaliação da obtenção do elétrodo de pasta de carbono seletivo para a furazolidona, o primeiro passo foi comparar o elétrodo MIP com o controlo NIP. Para isso foram colocados ambos os elétrodos em incubação numa solução de furazolidona de 1mM por igual período de tempo (10 minutos). De seguida executou-se a medição

voltamétrica. Os resultados obtidos estão representados na *figura 3.3*

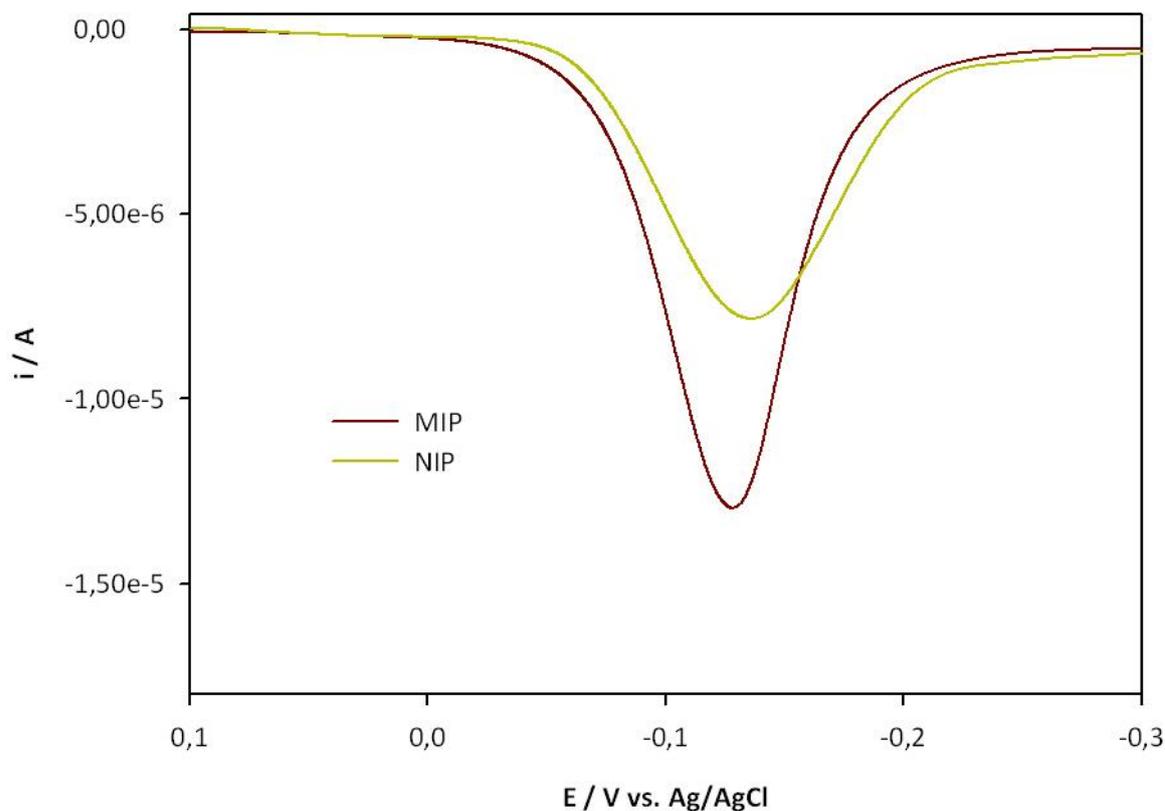


Figura 3.3 – Voltamogramas relativos à análise com sensor MIP e NIP após incubação durante 10 minutos em FDZ 1mM. Eletrólito de suporte: H_2SO_4 0,5M; Voltametria de onda quadrada 100 Hz

Analisando os resultados verificou-se o aparecimento de um pico de redução relativo à furazolidona usando ambos os sensores. O pico de redução tem um potencial de -0,15V. O valor da intensidade de corrente do pico do fármaco (furazolidona) correspondente ao eléctrodo do MIP é maior que o valor de intensidade de corrente do pico do fármaco correspondente ao NIP. Desta forma podemos afirmar que há cavidades seletivas para a furazolidona através de um MIP. É importante referir que durante a medição eletroquímica as únicas moléculas de fármaco presentes são as que foram adsorvidas pelos eléctrodos durante a incubação. Verifica-se que para o NIP há adsorção de moléculas de FDZ devido ao facto de observarmos um pico com este sensor. Esta adsorção ocorre à superfície do eléctrodo. Como no MIP o sinal é maior,

esta diferença pode estar relacionada com a presença de cavidades e portanto há a adsorção de um maior número de moléculas.

De modo a confirmar estes resultados, foram realizados 4 ensaios consecutivos com cada um dos sensores. Os resultados obtidos estão ilustrados na *figura 3.4*.

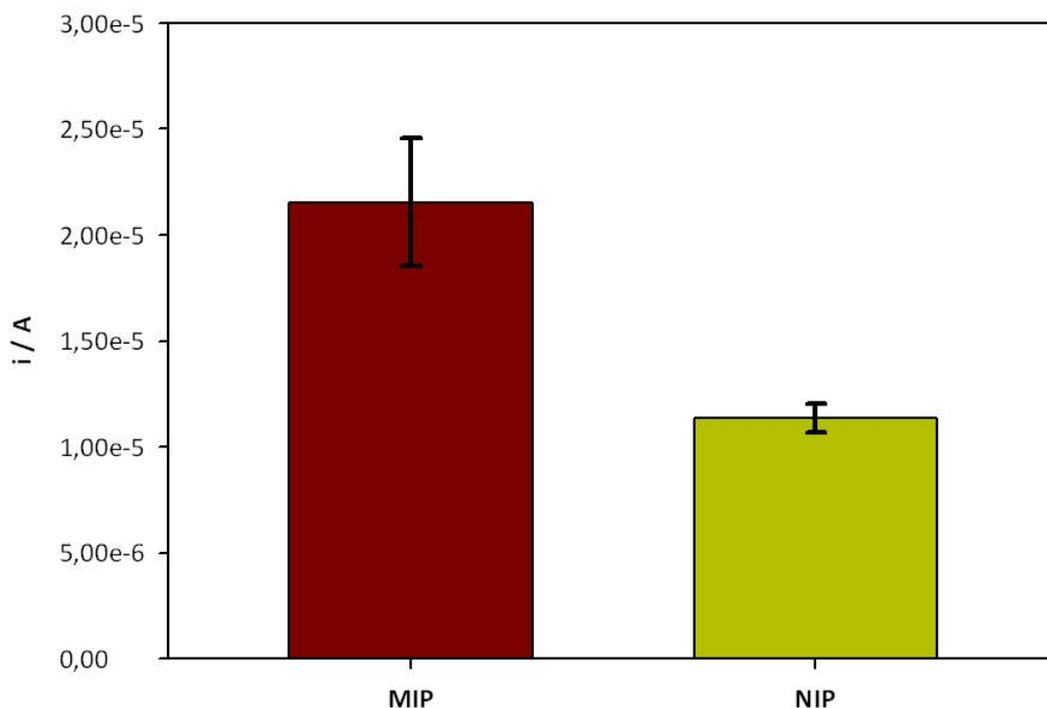


Figura 3.4 – Concentração da intensidade de corrente do pico de FDZ obtido com um MIP e um NIP

Os resultados confirmam que a média dos sinais obtidos com o MIP é superior ao NIP.

3.2.2. pH de medição

Posteriormente estudou-se a variação da intensidade de corrente do pico em função do pH da solução usada na célula voltamétrica. A otimização do pH é um passo importante nos processos de oxidação/redução. O pico do fármaco (furazolidona)

pode variar em termos de largura, altura (intensidade) e nitidez conforme a variação do pH. Deste modo o sensor MIP foi incubado em soluções de furazolidona 1mM realizando-se análises voltamétricas em diferentes meios. Os pH's analisados foram os seguintes: 0,5, 3, 5, 7 e 9.

Os resultados obtidos estão expressos nas *figuras 3.5 e 3.6*.

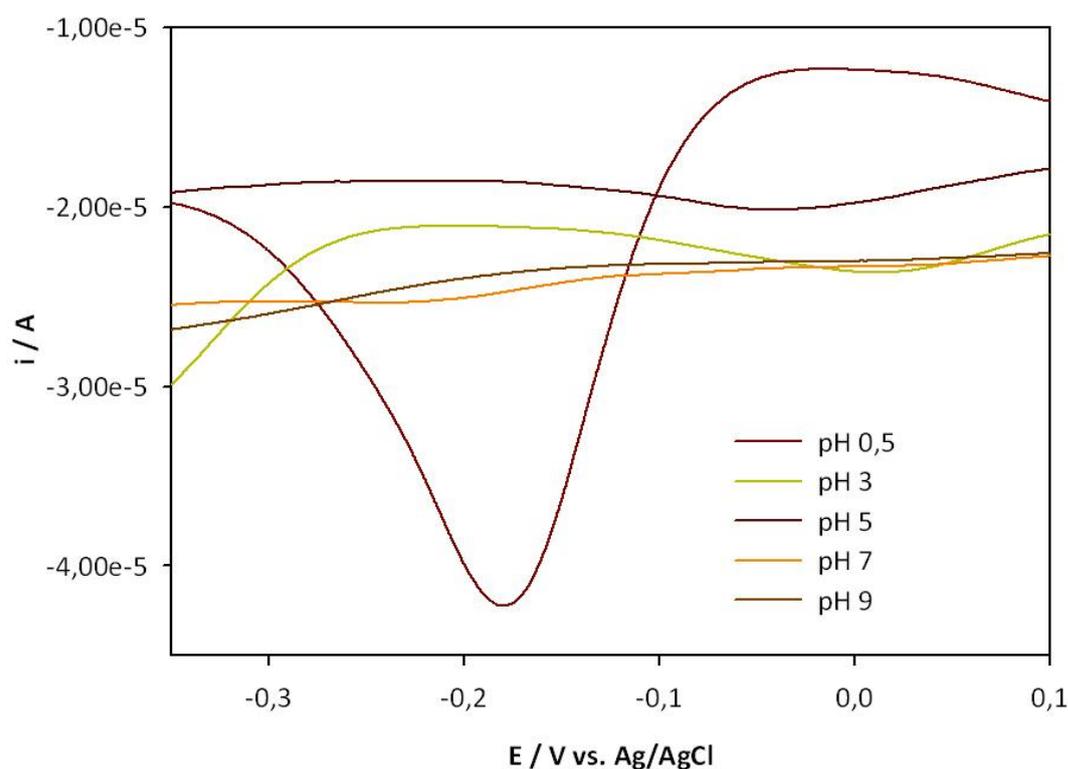


Figura 3.5 – Voltamogramas de redução da FDZ em função do pH de medição. Voltametria de onda quadrada 100 Hz; Incubação 10 minutos em FDZ 1mM

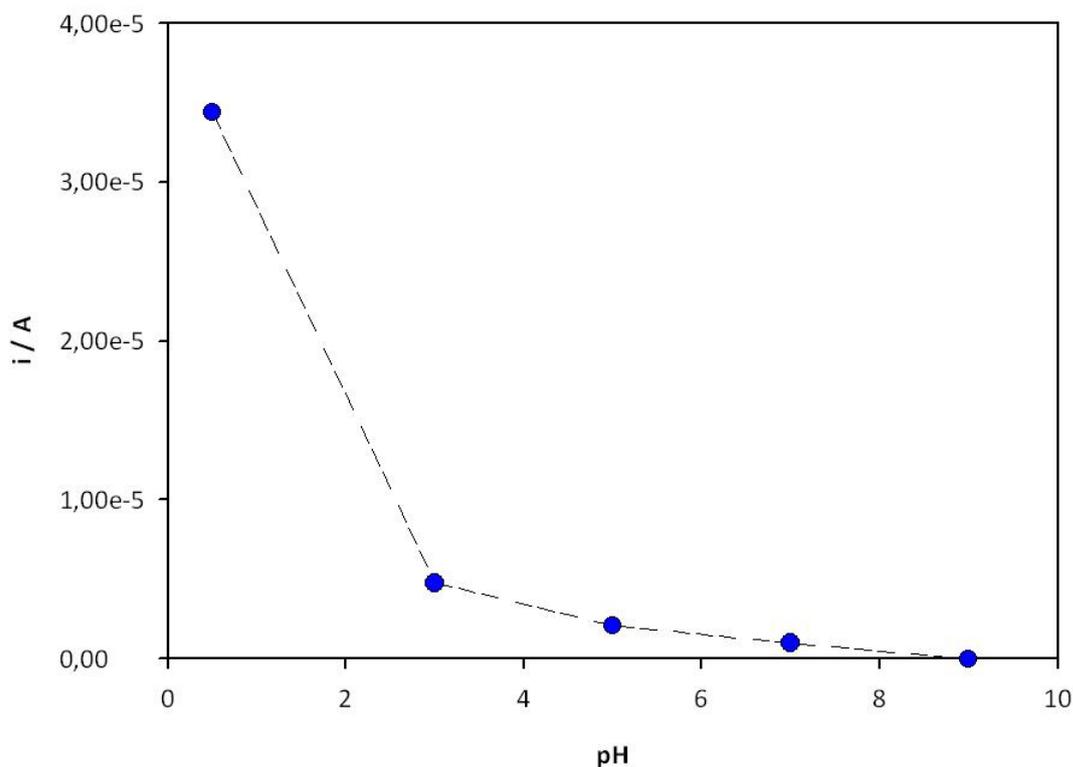


Figura 3.6 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do pH de medição

Após várias análises para cada pH, concluiu-se que o pH 0,5 é o ideal para a realização das medições. À medida que se aumenta o pH há uma diminuição de intensidade do pico. Para o valor mais alto (pH 9) não se verifica redução da furazolidona.

3.2.3. Otimização da quantidade de polímero na pasta de carbono

Depois de verificado que o pico do fármaco correspondente ao elétrodo que continha MIP era superior ao pico correspondente do NIP e otimizado o pH de medição o próximo passo consistiu na otimização da quantidade de polímero misturada com grafite para formar a pasta de carbono. Para isso prepararam-se elétrodos com diferentes quantidades de polímero variando entre os seguintes valores:

0,005g, 0,008g, 0,009g, 0,010g e 0,012g. Para cada eléctrodo procederam-se a incubações em FDZ e correspondentes medições voltamétricas. Na *figura 3.7* encontram-se os resultados obtidos.

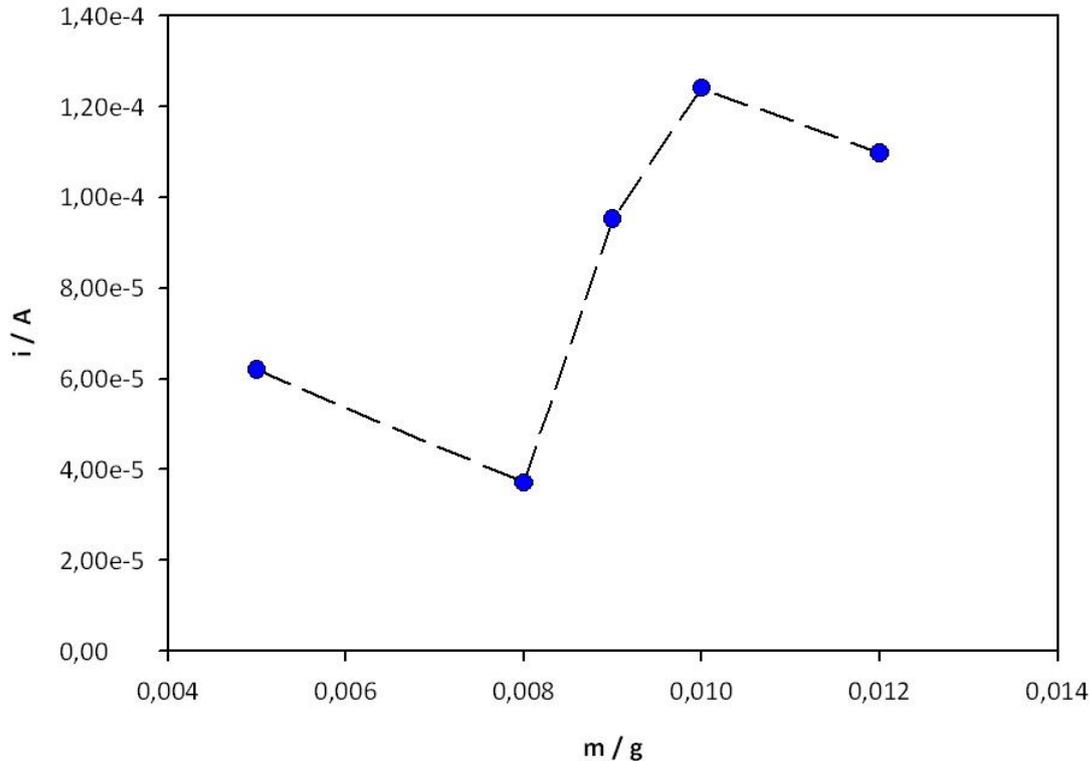


Figura 3.7 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função da quantidade de polímero usado na preparação da pasta de carbono

Verifica-se que há um aumento da intensidade do pico com o aumento da massa de polímero até às 0,010g. A partir daqui parece haver um decréscimo ou estabilização do sinal. Este modo conclui-se que o valor ideal é de 0,010g.

3.3. Otimização das condições de incubação

O próximo passo consistiu no estudo e otimização de várias condições de incubação.

3.3.1. Tempo

Um dos fatores mais importantes na utilização do sensor pelo procedimento descrito é o tempo de incubação, isto é, o tempo que o eléctrodo com pasta de carbono tem de estar mergulhado na solução de furazolidona para que a análise seja a melhor.

Para isso incubou-se o eléctrodo MIP em períodos de 1, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos em soluções de furazolidona 1mM de modo a perceber qual a influência deste parâmetro na resposta voltamétrica.

Na *figura 3.8* é possível visualizar os resultados obtidos.

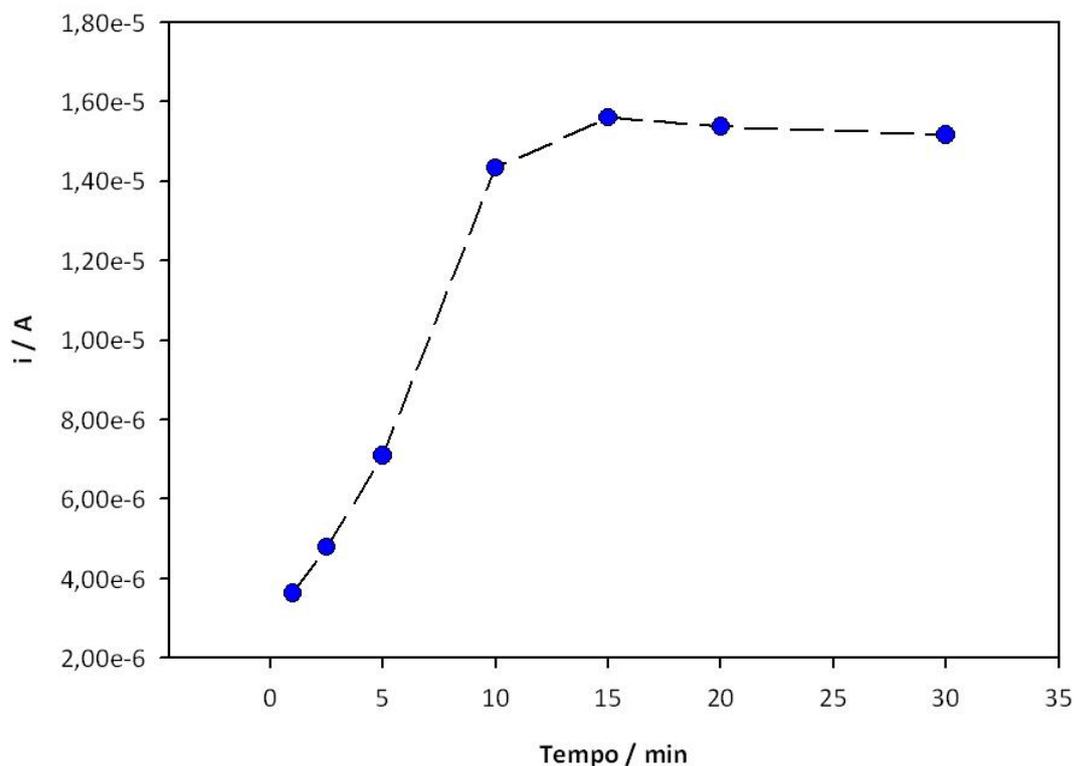


Figura 3.8 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do tempo de incubação

Analisando os dados verifica-se um aumento muito rápido do sinal até aos dez minutos. A partir dos quinze minutos de incubação, o pico do fármaco não aumenta mais, atingindo uma estabilização da intensidade ocorrendo assim a sua saturação.

Visto isto, definiu-se como tempo ótimo de incubação para o sensor como 20 minutos. Podemos concluir que este é um fator muito importante para a resposta do sensor.

3.3.2. pH de incubação

Outro parâmetro importante com influência na eficiência da incubação é o pH da solução de incubação. Isto porque considerando que a ligação polímero-furazolidona será uma ligação não-covalente, a forma química como o fármaco se encontra no meio é determinante. Deste modo procedeu-se a um estudo da influência do pH da solução de incubação na resposta do sensor. Para este estudo prepararam-se soluções de furazolidona 1mM em diferentes pH's: 0,5, 3, 5, 7 e 9. O sensor foi incubado em cada uma dessas soluções. Na *figura 3.9* encontram-se os resultados obtidos.

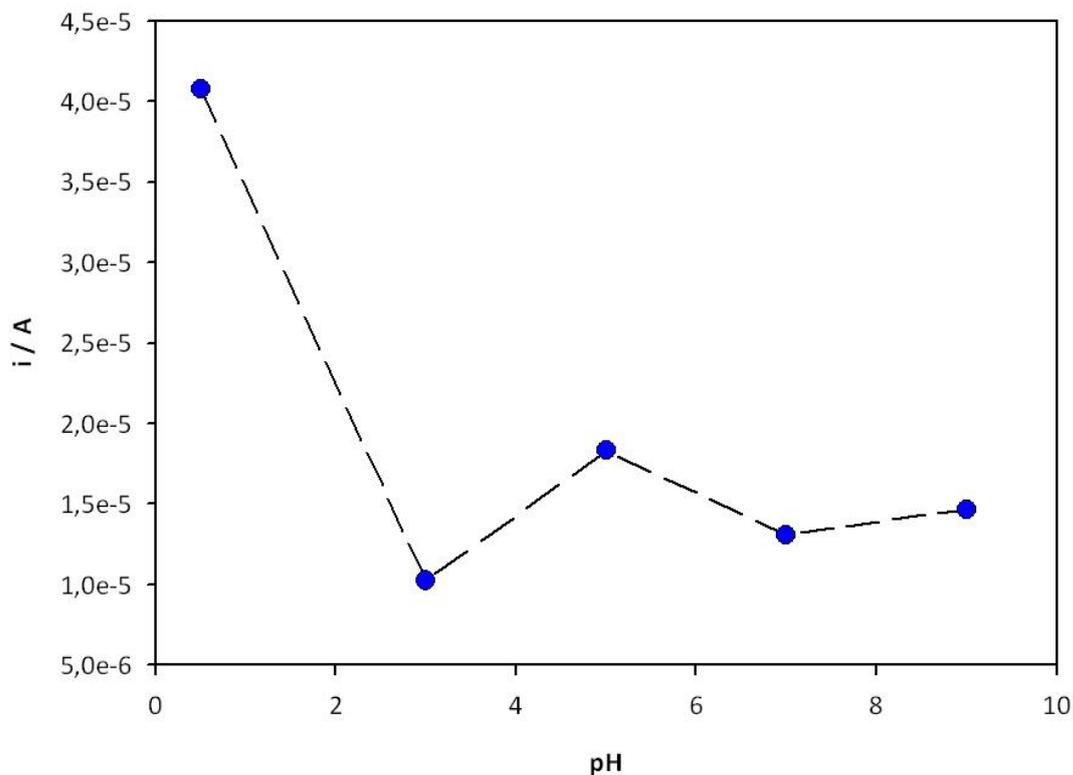


Figura 3.9 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do pH do meio de incubação

Podemos verificar que há uma diferença muito significativa entre o 0,5 e os restantes valores de pH. Entre os pH's 3 e 9 não se verifica quase nenhuma diferença. Deste modo todas as soluções de incubação foram ajustadas para pH's de 0,5. Provavelmente para este pH as moléculas de furazolidona encontra-se todas numa forma que permite ligações mais fortes com o polímero. Para valores mais altos de pH as ligações formadas são mais fracas.

3.3.3. Efeito agitação magnética

Na otimização das condições de incubação foi testado ainda, o efeito da agitação magnética da solução de incubação. Teoricamente a incubação com agitação magnética poderia contribuir para uma melhor difusão das moléculas de furazolidona para o sensor e deste modo aumentar o valor de intensidade de corrente do pico do fármaco. Assim procederam-se a incubações com e sem agitação magnética da solução de furazolidona (*figura 3.10*).

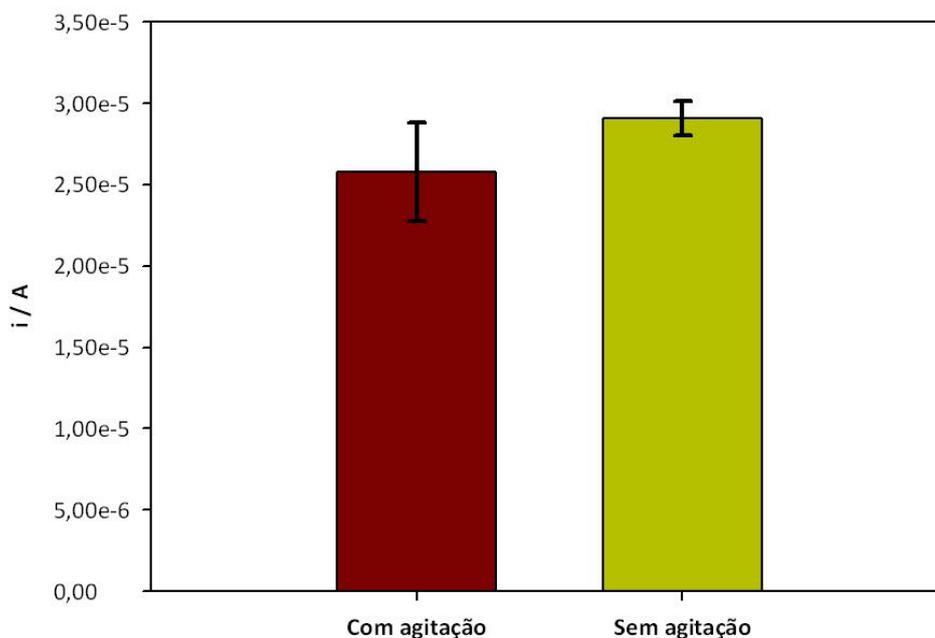


Figura 3.10 – Gráfico da intensidade de corrente para incubações com e sem agitação magnética

Contrariamente ao esperado não se verificam diferenças significativas entre os ensaios realizados. Deste modo é possível afirmar que este não é um parâmetro muito importante na eficiência da incubação. Todavia, foi utilizado este método (com agitação).

3.4. Otimização das condições de remoção

Para finalizar os estudos de otimização foram avaliados as condições de remoção do fármaco.

3.4.1. Solvente de remoção

Inicialmente foram avaliados solventes orgânicos para a remoção do fármaco do polímero de forma a libertar totalmente as cavidades após análise. Testou-se extrações em metanol e acetonitrilo. Apesar de ser possível remover a furazolidona com acetonitrilo verificou-se que este solvente degradava a pasta de carbono ao fim de algumas remoções consecutivas. Deste modo optou-se por extrações aquosas variando-se o pH de forma a encontrar o valor ideal. Apenas foi possível remover o fármaco para pH's alcalinos. Então foi utilizada uma solução de NaOH de 0,1M para proceder às remoções.

3.4.2. Tempo de remoção

Além do tipo de solvente outro fator fundamental é o tempo de remoção, isto é, o tempo que o elétrodo de pasta de carbono necessita de estar mergulhado no solvente para que o fármaco (furazolidona) seja completamente extraído.

A avaliação deste parâmetro foi elaborada através da realização de sucessivas incubações e respetiva extração por períodos de tempo diversos. Para cada período de extração foi realizado a medição voltamétrica. Iniciou-se o estudo com 5 minutos de extração. Aumentou-se sucessivamente o tempo até não se observar qualquer pico na medição voltamétrica.

Os resultados obtidos estão ilustrados nas *figuras 3.11 e 3.12*.

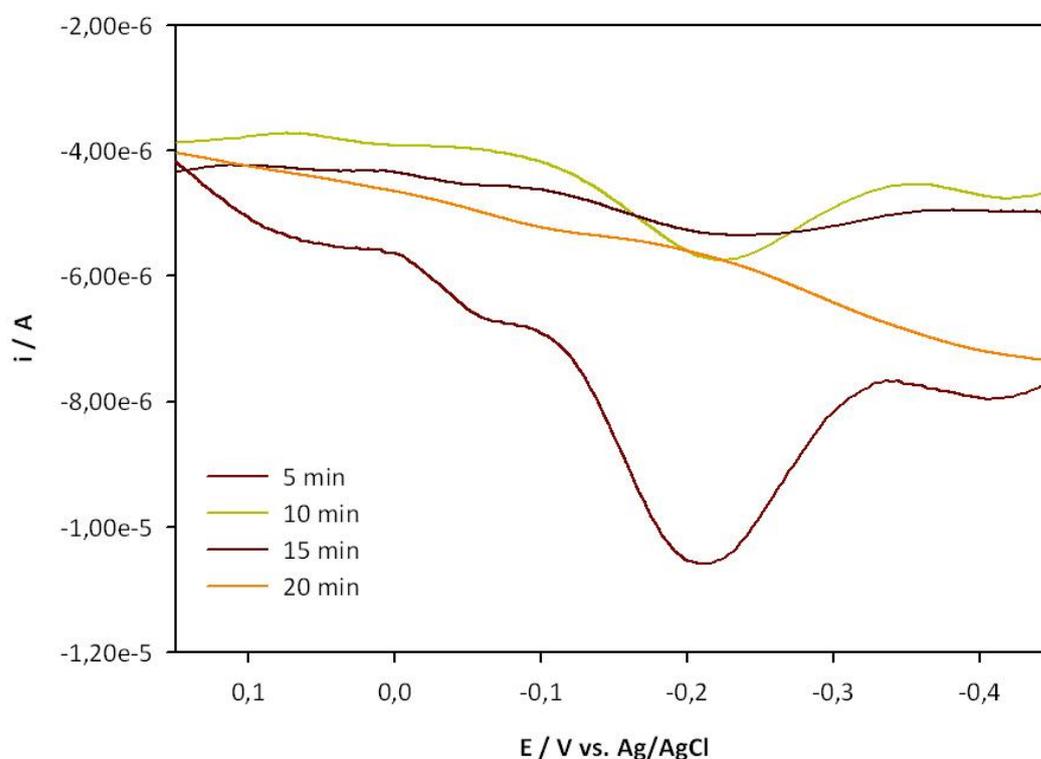


Figura 3.11 – Voltamogramas relativos ao estudo do tempo de extração em NaOH 0,1M. Eletrólito de suporte: H₂SO₄ 0,5M; Voltametria de onda quadrada 100 Hz; Incubação 10 minutos em FDZ 1mM

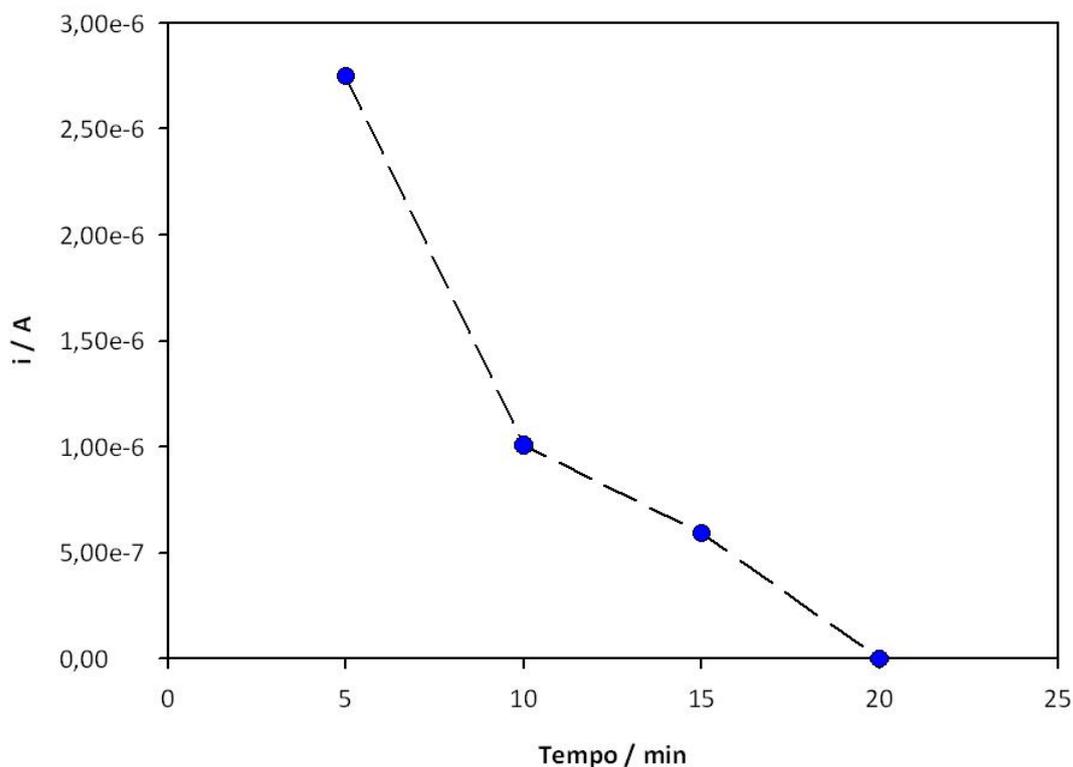


Figura 3.12 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função do tempo de remoção em NaOH 0,1M

Os resultados obtidos permitem verificar que para 5 minutos de extração há um pico de redução da furazolidona, pelo que não há remoção completa. Aumentando o tempo há uma diminuição clara do sinal até não se verificar nenhum pico aos 20 minutos (ver voltamograma da *figura 3.11*). Estes resultados permitem confirmar a remoção completa do fármaco. Por outro lado o facto de serem necessários 20 minutos de extração permite concluir que a ligação entre o polímero e o fármaco é relativamente forte. Esta ligação sendo forte confirma a qualidade das cavidades formadas. Podemos concluir que este é um fator muito importante para determinar o tempo necessário antes de proceder a uma nova análise.

3.5. Performance analítica

Depois de fabricar e desenvolver um sensor é importante estudar a sua resposta analítica, isto é, como se relaciona os sinais obtidos com a concentração de FDZ (curva de calibração) e qual a precisão dos ensaios (repetibilidade e reprodutibilidade). Além disso estudou-se ainda a resposta do sensor na presença de 3 interferentes que aparecem em grande concentração na amostra (urina).

3.5.1. Curva de calibração

A curva de calibração é um passo importante para a implementação de um sensor para a furazolidona pois permite estudar a linearidade da resposta analítica. Além disso pode ser usada para estimar os limites de deteção e quantificação da metodologia. Para a construção da curva realizaram-se incubações do sensor em soluções padrão de FDZ com concentrações crescentes de FDZ, desde 1 até 100 μM , verificando-se o pico do fármaco (intensidade) para cada uma delas. Os voltamogramas registados estão representados na *figura 3.13*.

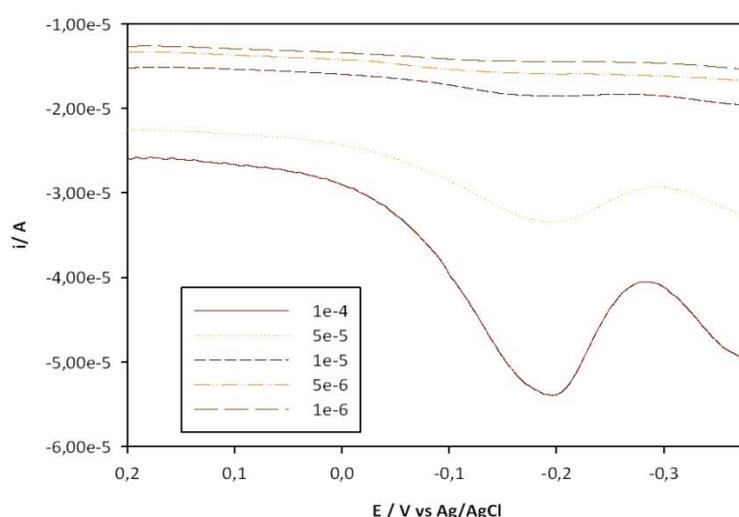


Figura 3.13 – Voltamogramas relativos obtidos para a incubação do sensor em diferentes concentrações de FDZ

De seguida, com dos dados obtidos contraiu-se a curva de calibração representando a intensidade do pico em função da concentração e fez-se um ajuste linear aos pontos obtidos (figura 3.14).

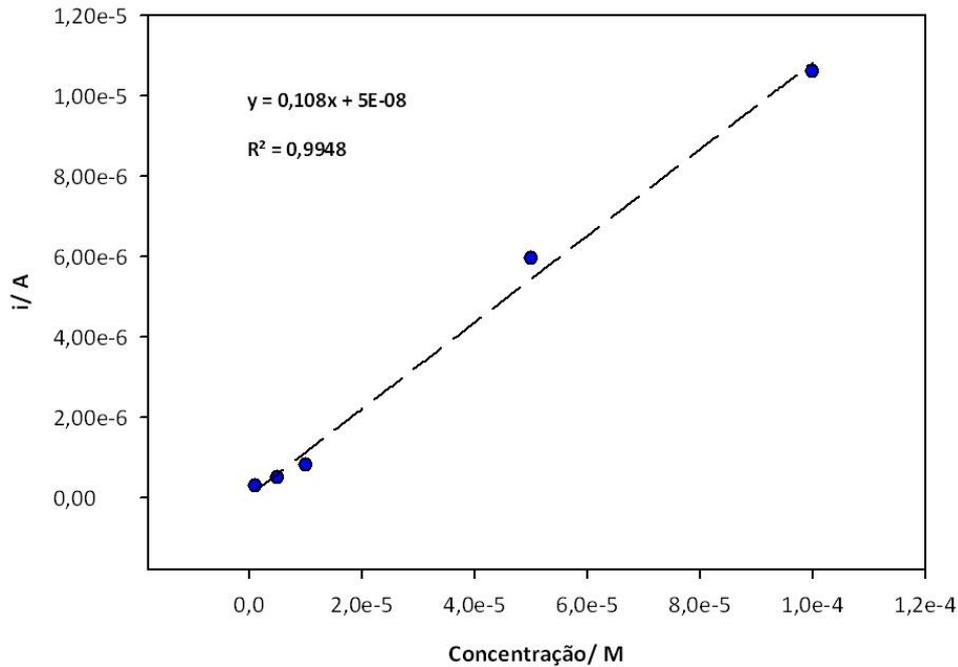


Figura 3.14 – Gráfico da variação da intensidade de corrente do pico em função da concentração de FDZ

Verifica-se um ajuste linear para a gama de concentrações estudadas, com um declive de 0,108 e com um R^2 de 0.9948. Com estes dados estimou-se um limite de deteção de $1\mu\text{M}$ (tendo em conta que este é o ponto mais baixa da reta que conseguimos detetar).

3.5.2. Repetibilidade e Reprodutibilidade

A precisão da metodologia analítica foi avaliada através da repetibilidade e da reprodutibilidade. A repetibilidade está relacionada com a variação da resposta analítica no mesmo dia, enquanto a reprodutibilidade é referente às variações entre dias. Foi selecionada uma concentração do fármaco de $10\mu\text{M}$ para a realização deste estudo. Para os ensaios de repetibilidade foram realizadas quatro análises consecutivas no mesmo dia para esta concentração. Na Tabela 1 estão indicados os valores obtidos.

Tabela 1- Tabela referente à repetibilidade dos ensaios

Repetibilidade	
Ensaio 1	1,33E-06
Ensaio 2	1,15E-06
Ensaio 3	1,29E-06
Ensaio 4	1,17E-06
Média	1,24E-06
Desvio-padrão	8,85E-08
Cv %	7,2

Foi calculado um Cv de cerca de 7%. Ainda que o valor pudesse ser um pouco mais baixo é um valor satisfatório e normal para este tipo de elétrodo, tendo em consideração o procedimento utilizado. É importante referir que a passagem do sensor da incubação para a medição voltamétrica pode introduzir alguns erros.

Foram ainda realizados ensaios em 3 dias diferentes para a mesma concentração. Estes ensaios foram sempre realizados com o mesmo sensor. Os valores obtidos estão representados na tabela 2.

Tabela 2 - Tabela referente à reprodutibilidade dos ensaios

Reprodutibilidade	
Dia 1 - Ensaio 1	1,14E-06
Dia 2 - Ensaio 2	1,18E-06
Dia 2 - Ensaio 1	1,33E-06
Dia 2 - Ensaio 2	1,29E-06
Dia 2 - Ensaio 3	1,24E-06
Dia 3 - Ensaio 1	1,22E-06
Dia 3 - Ensaio 2	1,63E-06
Média	1,29E-06
Desvio-padrão	1,62E-07
CV %	12,6

Como seria de esperar o coeficiente de variância é maior para a variação ao longo dos dias. Foi obtido um valor de 13%. Tendo é conta o que foi expresso anteriormente este valor pode ser considerado satisfatório.

3.5.3. Seletividade

Um dos parâmetros mais importantes de um sensor molecularmente impresso é a seletividade. Por um lado, já foi confirmado a existência de cavidades no polímero, pela diferença de resultados entre o MIP e o NIP. No entanto todos os estudos até agora efetuados foram realizados em soluções contendo apenas o fármaco. Assim a finalidade do estudo de seletividade é verificar se quando na presença de outros compostos, o pico relativo à FDZ sofre ou não alterações. Se existir uma alteração significativa isso pode significar que as cavidades do polímero podem estar a ser obstruídas por outros compostos.

Para realizar este estudo foram selecionados três compostos que aparecem em grande quantidade na composição da urina: a glucose, o ácido ascórbico e a ureia. De seguida realizaram-se várias análises em que o sensor foi incubado em soluções contendo 0,1mM de FDZ e 1mM de interferente. Para cada interferente foram realizadas incubações nas condições ótimas de funcionamento do sensor. Registaram-se as leituras voltamétricas e os valores de intensidade de pico obtidos foram comparados com uma incubação em FDZ sem nenhum interferente. Os resultados obtidos foram expressos em termos de % de recuperação da FDZ (*figura 3.15*)

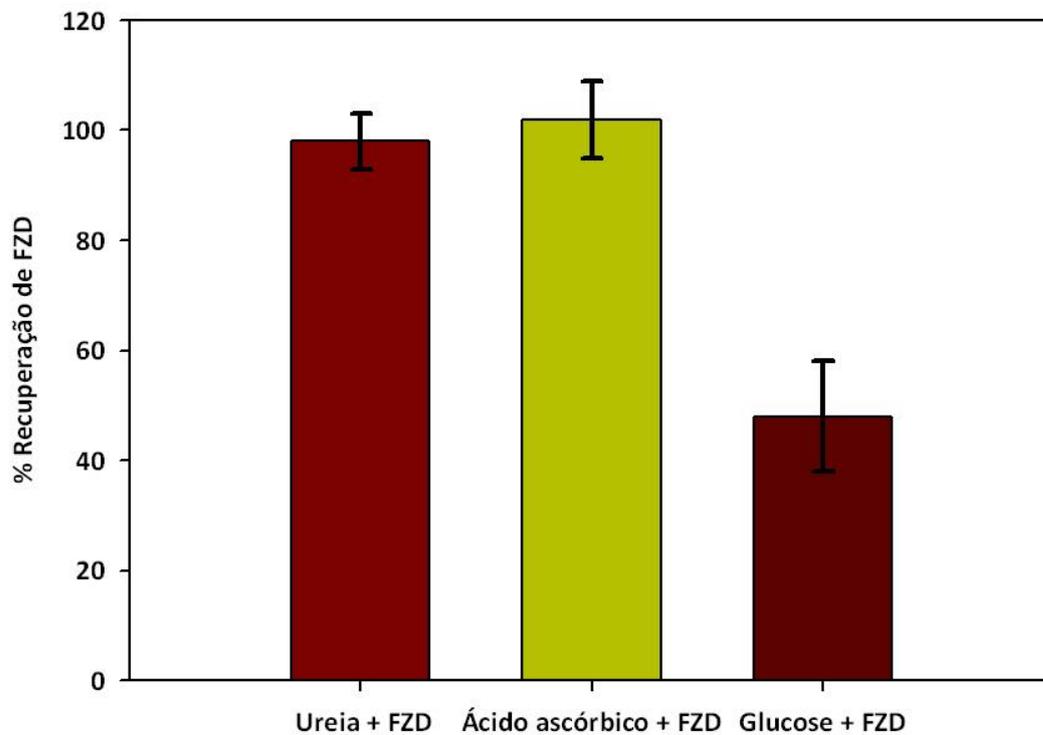


Figura 3.15 – Estudo na seletividade do sensor na presença de 3 interferentes

Relativamente à ureia e ao ácido ascórbico verifica-se que não existe uma diferença significativa no pico de FDZ. As taxas de recuperação são próximas de 100%, pelo que se pode afirmar que na presença destes dois interferentes o sensor apresenta seletividade total para a FDZ.

No entanto, no que diz respeito à mistura da furazolidona com a glucose observou-se um abaixamento da taxa de recuperação de FDZ para cerca de 50%, facto que se leva a concluir que este composto pode ser um interferente à análise de FDZ. Isto pode ocorrer porque, as cavidades formadas, ainda que apresentem seletividade para a FDZ pode também ligar-se com moléculas de glucose. É importante referir que este estudo foi realizado para concentrações de interferentes dez vezes superiores ao de FDZ. Possivelmente para concentrações mais próximas a taxa de recuperação de FDZ poderia ser mais elevada. Este efeito pode ser diminuído por correções do efeito de matriz seja diluído a amostra seja usando o método das adições padrão.

3.6. Aplicação em amostra real (urina)

Por fim, testou-se a utilização do sensor fabricado na deteção de furazolidona em amostras de urina. Este passo tinha como objetivo avaliar a capacidade de resposta do sensor quando colocado em amostras complexas como é o caso da urina. Até este ponto apenas tinham sido usadas soluções aquosas. Deste modo é fundamental pelo que a validação da resposta do sensor só fica completa quando comprovado a sua utilização em amostras reais. Utilizou-se uma amostra de urina que não continha os fármacos e foram feitas adições de concentrações conhecidas.

Na primeira fase procedeu-se à centrifugação da amostra de modo a remover algumas proteínas. De seguida ajustou-se o valor de pH com ácido. A urina fresca apresentava um pH de 6. Como se verificou no estudo de otimização do pH de incubação, o valor de incubação ótimo é cerca de 0,5 e daí a necessidade de se ajustar o pH. A urina foi ainda diluída 50% de modo a reduzir um pouco os problemas de seletividade relativos à glucose. Além disso a metodologia analítica apresenta limites de deteção que permitem perfeitamente a realização desta diluição ou até de fatores de diluição maiores. Além disso, pensado numa aplicação futura do sensor, com diluição há menor gasto de amostra.

O sensor foi então incubado em amostras de urina dopada com furazolidona 0,1mM nas condições otimizadas anteriormente. Os voltamogramas obtidos estão representados na *figura 3.16*.

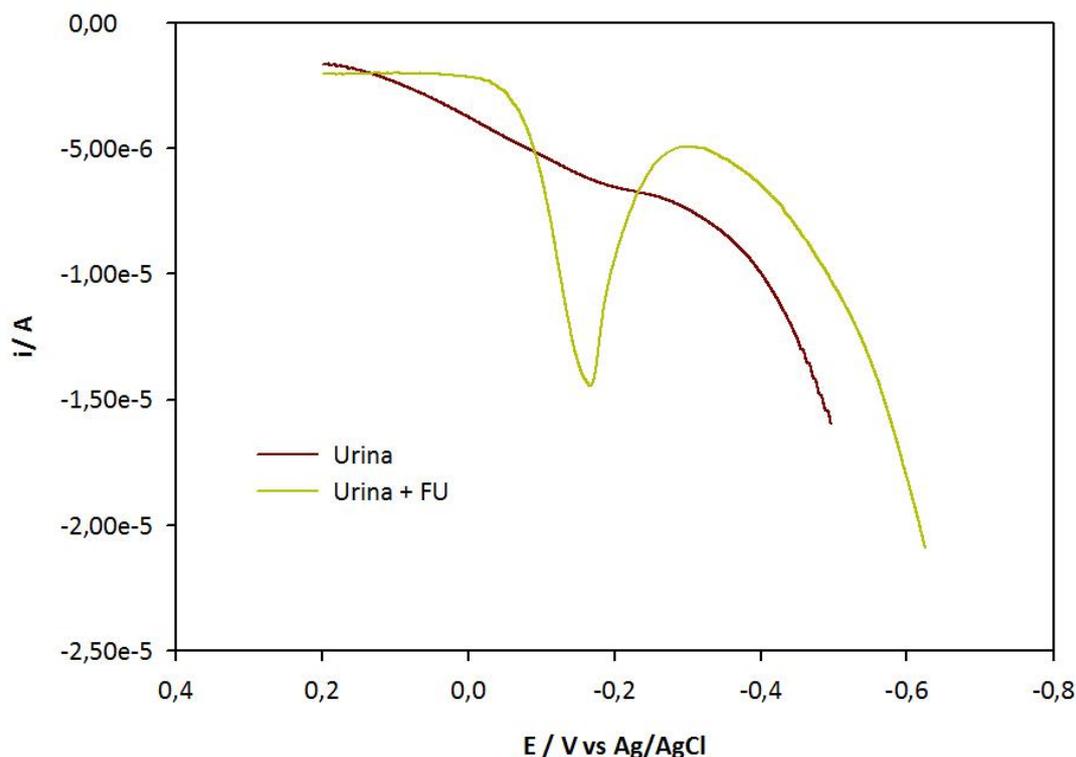


Figura 3.16 – Voltamogramas relativos à aplicação do sensor em amostras de urina

Os resultados obtidos permitem confirmar a aplicabilidade do sensor. O voltamograma relativo à amostra de urina não apresenta qualquer pico. Como a amostra não continha o fármaco é possível afirmar que não aparece nenhum pico que possa interferir com análise da furazolidona. Por outro lado, quando se adiciona furazolidona na amostra é possível observar claramente o seu pico de redução no voltamograma. Isto indica a capacidade do sensor para se ligar ao composto na amostra real. Estimou-se uma taxa de recuperação de 97% com um desvio padrão de 4%.

4. Conclusão

O grande interesse na determinação de fármacos em fluídos biológicos, nomeadamente na urina, para avaliação da dosagem ótima a ministrar a cada paciente e estudar o ciclo do medicamento no organismo, justifica o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais sensíveis e precisos. A maioria destes métodos necessita de pré-tratamento da amostra, técnicos altamente qualificados e instrumentos sofisticados, sendo dispendiosos e demorados. Por estes fatores, as técnicas eletroquímicas são alternativas cada vez mais recorrentes, especialmente no desenvolvimento de sensores sensíveis, seletivos, de fácil fabrico e de baixo custo.

Neste trabalho foi desenvolvido com sucesso um novo sensor eletroquímico seletivo para a deteção de furazolidona por voltametria de onda quadrada. Com essa finalidade fabricou-se um elétrodo de pasta de carbono modificado com um polímero molecularmente impresso. Este procedimento de preparação de um sensor, apresenta-se muito promissor para o desenvolvimento de novos sensores químicos, principalmente no que diz respeito ao modo de preparação e utilização. O polímero garante a existência de pontos de ligação específica entre polímero e FDZ na resposta comprovam os resultados obtidos, nomeadamente na comparação entre MIP e NIP. Os resultados obtidos no estudo de seletividade ajudam a comprovar este facto. Este é o primeiro sensor voltamétrico desenvolvido com seletividade específica para FDZ.

Foi estudada a resposta eletroquímica do sensor e otimizados os parâmetros de análise. Conclui-se que o tempo de remoção e o tempo de extração são dois parâmetros com grande influência na resposta analítica. A necessidade de remoção de FDZ entre análises é dos pontos críticos no tempo da análise, que limita a comercialização deste tipo de sensor. Isto pode ser ultrapassado desenvolvendo um sensor descartável ou alternativamente trocando o passo de remoção pela renovação de superfície do elétrodo entre análises.

O sensor apresenta valores de repetibilidade e reprodutibilidade satisfatórios de 7 e 13% respetivamente. Este é um dos pontos que necessita ser melhorado de modo a permitir a incorporação deste tipo de sensor em análise de rotina. Estes valores podem ser devidos ao procedimento usado. Após incubação o sensor tem que ser transportado desde a solução de incubação até à célula voltamétrica, facto que pode introduzir alguns erros. Devem ser estudados processos que permitam reduzir os desvios entre ensaios. Estimou-se um limite de deteção de 1 μ M. Embora este valor possa ser considerado alto, é suficiente para deteção na amostra estudada. Contudo, poderá ser importante estudar técnicas de baixar este limite, como por exemplo adicionar nanotubos de carbono à pasta. Deste modo talvez seja possível aplicar o sensor em amostras ambientais, onde as quantidades de fármacos exigem limites de deteção mais baixos.

Por fim aplicou-se o sensor numa amostra de urina, onde se observou um pico de intensidade relativo ao fármaco adicionado à amostra. Desde modo comprovou-se a aplicabilidade de sensor na análise em amostras complexas. É importante referir que este sensor pode ser usado com um tratamento de amostra muito reduzido.

Pode-se concluir que a tecnologia de polímeros molecularmente impressos oferece grandes vantagens na preparação de sensores químicos, mais estáveis, robustos e seletivos. O sensor desenvolvido apresenta um fabrico fácil e de baixo custo, apresentando potencial para desenvolvimentos futuros com vista à utilização comercial.

Referências

- [1] A.J. Fry, A., Harper, & Row. (1972). *Synthetic Organic Electrochemistry*: 40-51
- [2] Abraham, R., Knapp, J., Minnigh, M., Wong, L., M.A., Z., & Alvin, J. (1984). *Reductive metabolism of furazolidone by Escherichia coli and rat liver in vitro*. *Drug Metabolism and Disposition* 12: 732-750
- [3] *Administração Central do Sistema de Saúde*. (s.d.). Obtido em 29 de Maio de 2013, de <http://www.acss.min-saude.pt/>
- [4] Adams, R. N. (1963). *Rev. Polarog.*
- [5] Adams, R. N. (1969). *Electrochemistry at Solid Electrodes*.
- [6] *American Medical Association*. (s.d.). Obtido em 28 de Maio de 2013, de <http://www.ama-assn.org/ama>
- [7] Anonymous. (1974). *Furazolidone (NF-180)*. *Federal Register* 41: 19906-19921
- [8] Bilge, H. T. (Maio (2010)). *Cyclic Volumetric And Shear Strain Responses Of Fine-Grained Soils*. Middle East Technical University: 50-90
- [9] Brander, G. C., & Pugh, D. M. (1971). *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*: 10-12
- [10] Crespilho, F. N., & Oliveira Rezende, M. O. (Novembro (2004)). *Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso*. São Paulo: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- [11] Crow, D. (1994). *Principles and Applications of Electrochemistry*. Blackie Academic and Professional: 60-65
- [12] Duku, P. M., Stewart, J. P., Whang, D. W., & Yee, E. (2008). *Volumetric strains of clean sands subject to cyclic loads*”, *J. Geotechnical and Geoenvironmental Eng*: 20-23

- [13] *Ebah.* (s.d.). Obtido em 06 de Junho de 2013, de Voltametria e polarografia:
<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABJ9oAL/voltametria-polarografia>
- [14] Fotouhi, L., M. Nemati. (2011). *Electrochemistry and voltammetric determination of furazolidone with a multi-walled nanotube composite film-glassy carbon electrode.* Journal of Applied Electrochemistry 41 (2): 137-142.
- [15] Fu, Y. (2003). *Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers and Their Application in Preconcentrators for Gas Phase Sensors.* West Virginia University: 150-158
- [16] Galeano Díaz, T., Guiberteau Cabanillas, A., Acedo Valenzuela, M., Correa, C., & Salinas, F. (Março (1997)). *Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.* Badajoz: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Extremadura: 68-80
- [17] Galeano Díaz, T., López-Martínez, L. (1993). *Semiautomatic determination of furazolidone and furaltadone by continuous and stopped flow FIA methods.* Microchimica Acta 112.31-39
- [18] Galus, Z., & Adams, R. N. (1963). *J. Phys. Chem:* 866-870
- [19] Goncalves, M., Sigg, L., & Stumm, W. (1986). *Voltammetric methods for distinguishing between dissolved and particulate metal ion concentrations in the presence of hydrous oxides.* Environ. Sci. Technol: 141-146
- [20] Grow, D., & Westwood, J. (1968). *Polarography.* Methuen and Co. LTD: 30-35
- [21] Heinze, J. (1984). *Cyclic Voltammetry-Electrochemical Spectroscopy:* 10-20
- [22] Horvath, V., Lorantfy, B., Tóth, B., Bognar, J., Laszlo, K., & Horvai, G. (2009). *Preparation of terbutylazine imprinted polymer microspheres using viscous polymerization solvents.* Journal of Separation Science 32: 80-87
- [23] Hu, X.Z., Xu, Y., et al. (2007). *Determinations of Residual Furazolidone and Its Metabolite, 3-Amino-2-oxazolidinone (AOZ), in Fish Feeds by HPLC-UV and LC-MS/MS, Respectively.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(4): 1144-1149.

- [24] Hunnius, M., Rufinska, A., & Maier, W. F. (1999). *Microporous And Mesoporous Materials*:389-403
- [25] *Infarmed*. (s.d.). Obtido em 27 de Maio de 2013, de <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED>
- [26] *Innovation.org*. (s.d.). Obtido em 25 de Maio de 2013, de <http://www.innovation.org/>
- [27] *Instituto Presbiteriano Mackenzie*. (s.d.). Obtido em 15 de Junho de 2013, de Faculdade de Ciências Biológicas, Exatas e Experimentais: <http://www.mackenzie.br/7487.html>
- [28] Jacobs, E. S. (1963). *Anal. Chem*: 2112-2120
- [29] Jianzhong, S., Fangyang, H., Caiwei, F., Yuping, W., Xiaoping, W., Caimao, F., et al. (Maio (2006)). *ELISA kit for detecting furazolidone metabolites and detection method thereof*. Beijing Wanger Biotechnology.
- [30] Kugimiya, A., & Takeuchi, T. (1999). *Analytical Sciences*: 24-28
- [31] Lindquist, J. (1968). *J. Electroanal. Chem*: 204-210
- [32] Ling, T., Syu, Y., Tasi, Y., Chou, T., & Liu, C. (2005). *Biosensors And Bioelectronics*: 901-907
- [33] Liu, R. (1997). *Voltammetric Study Of Interaction Of Copper And Model Fungal Secreted Ligands*. B.E. Harbin Engineering University: 40-150
- [34] McCracken, R. J., & Glenn Kennedy, D. (1997). *Determination of furazolidone in animal feeds using liquid chromatography with UV and thermospray mass spectrometric detection*. *Journal of Chromatography A* 771 (1 – 2): 349-354.
- [35] *MedicineNet.com*. (s.d.). Obtido em 02 de Junho de 2013, de <http://www.medicinenet.com/furazolidone-oral/page2.htm>
- [36] Molinelli, A. (14 de October de October (2004)). *Molecularly Imprinted Polymers: Towards a Rational Understanding of Biomimetic*. Georgia (EUA): Georgia Institute of Technology: 4-33
- [37] Monien, H., Specker, H., & Zinke, K. (1967). *Fresenius Z.Anal. Chem*: 342-350

- [38] Mustafa, A., All, B., & Hassan, T. (1986). *The effect of furazolidone on some clinical and biochemical parameters in goats*. The Veterinary Quarterly: 89-99
- [39] Nakabeppu, N., & Tatsumi, K. (1984). Metabolism of furazolidone in rats: 4193-4208
- [40] Pantex Holland, B. (2013). *Furazolidone*. Veterinary Pharmaceutical Products.
- [41] Parham, H., & Esfahani, B. A. (2008). *Determination of furazolidone in urine by square-wave voltammetric method*. Journal of the Iranian Chemical Society 5(3): 453-457.
- [42] Pfizer. (s.d.). Obtido em 27 de Maio de 2013, de <https://www.pfizer.pt/As-fases-de-desenvolvimento-171.aspx>
- [43] Phillips, K., & Hailey, F. (1986). *The use of furoxone: a perspective*. Journal of International Medical Research: 19-30
- [44] Pinel, C., Loisil, P., & Gallezot, P. (1997). *Advanced Materials*: 582-585
- [45] Prasad, C. V. N., Sripriya, V., et al. (1999). *Simultaneous determination of tinidazole, furazolidone and diloxanide furoate in a combined tablet preparation by second-derivative spectrophotometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 21(5): 961-968.
- [46] Scarano, G., Gramanti, E., & Zirino, A. (1992). *Determination of copper complexation in sea water by a ligand competition technique with voltammetric measurement of the labile metal fraction*. Anal. Chim. Acta: 153-161
- [47] Sellergren, B., Ed., & Elsevier. (2001). *Molecularly imprinted polymers. Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*: 31-70
- [48] Shiomi, T., Matsui, M., Mizukami, F., & Sakaguchi, K. (2005). *Biomaterials*: 5564-5571
- [49] Soleimani, Majid, Afshar, Majid Ghahraman, Shafaat, Atefeh, & Crespo, Gastón A. *High-Selective Tramadol Sensor Based on Modified Molecularly Imprinted Polymer@Carbon Paste Electrode with Multiwalled Carbon Nanotubes*. Electroanalysis.
- [50] Spivak, D. (2005). *Selectivity in molecularly imprinted matrices*. Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology: 4388-4410

- [51] Svancara, I., Kotzian, P., Bartos, M., & Vytras, K. (2005). *Electrochem. Commun*: 2-22
- [52] Svec, F., Tennikova, T. B., & Deyl, Z. (2003). *Monolithic materials. Preparation, properties and applications*. Journal of Chromatography Library: 50-90
- [53] Tatsumi, K., Ou, T. Y., Yoshimura, H., Koga, H., & Horiuchi, T. (1978). *Isolation and identification of the metabolite of N-(5-nitro-2-furfurylidene)-3-amino-2-oxazolidone*. Journal of Pharmacobio-Dynamics 1: 2418-2490
- [54] Tatsumi, K., Yamada, H., Yoshimura, H., & Kawazoe, Y. (1981). *Metabolism of furazolidone by milk xanthine oxidase and rat liver 9000 g supernatant: formation of an unique nitrofurans metabolite and an aminofuran derivative*. Archives of Biochemistry and Biophysics: 256-262
- [55] Tóth, B. (2010). *Chromatographic properties of molecularly imprinted materials*. Budapest: Semmelweis University: 2-18
- [56] Tóth, B., László, K., & Horvai, G. (2005). *Chromatographic behavior of silica-polymer composite molecularly imprinted materials*. J. Chromatogr. A: 60-80
- [57] *Tua Saúde*. (s.d.). Obtido em 02 de Junho de 2013, de <http://www.tuasaude.com/furazolidona-giarlam/>
- [58] *University Of Cambridge*. (s.d.). Obtido em 06 de Junho de 2013, de Department of Chemical Engineering and Biotechnology: <http://www.ceb.cam.ac.uk/pages/linear-sweep-and-cyclic-voltametry-the-principles.html>
- [59] *User.Meds*. (s.d.). Obtido em 01 de Junho de 2013, de <http://www.usermeds.com/>
- [60] *Voltammetry*. (s.d.). Obtido em 05 de Junho de 2013, de <http://mail.chiangmai.ac.th/~scijjkmn/voltammetry.htm>
- [61] Vroomen, L. (Novembro (1987)). *In vivo and in vitro metabolic studies of furazolidone*: 331-350
- [62] Walsh, R. (Junho (2010)). *Development and characterisation of molecularly imprinted suspension polymers*. Waterford Institute of Technology: 40-150

