



Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química - Araraquara



Bianca Mortari

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE SENSOR
BIOMIMÉTICO COM TRADUÇÃO ÓPTICA SELETIVO AO CORANTE
VERDE ÁCIDO 16**

**ARARAQUARA
2019**

Bianca Mortari

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE SENSOR
BIOMIMÉTICO COM TRADUÇÃO ÓPTICA SELETIVO AO CORANTE
VERDE ÁCIDO 16**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Química do Instituto de Química, UNESP, Araraquara como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor

Coorientador: Dr. Sabir Khan

**ARARAQUARA
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Mortari, Bianca
M887d Desenvolvimento, otimização e aplicação de sensor
biomimético com tradução óptica seletivo ao corante verde
ácido 16 / Bianca Mortari. – Araraquara : [s.n.], 2019
94 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Maria del Pilar Taboada Sotomayor
Coorientador: Sabir Khan

1. Corantes. 2. Polímeros. 3. Detectores ópticos.
4. Análise ambiental. 5. Reflectância. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: “Desenvolvimento, otimização e aplicação de sensor biomimético com tradução óptica seletivo ao corante verde ácido 16”

AUTORA: BIANCA MORTARI

ORIENTADORA: MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR

COORIENTADOR: SABIR KHAN

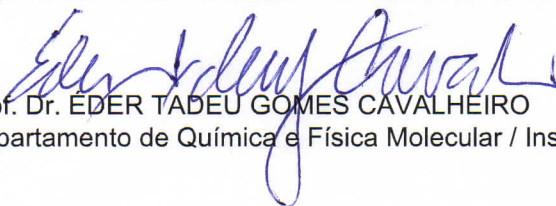
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof^a. Dr^a. MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. DENIS RICARDO MARTINS DE GODOI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ÉDER TADEU GOMES CAVALHEIRO
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 18 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Bianca Mortari

Data de Nascimento: 4 de dezembro de 1991

Naturalidade: Guariba – SP

Nacionalidade: Brasileira

Estado Civil: Solteira

Filiação: Marli Aparecida Bezan Mortari e Antônio Roberto Aparecido Mortari

ENDEREÇO PROFISSIONAL:

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara.

Rua Prof. Francisco Degni, 55 - Quitandinha

14800-060 - Araraquara, SP – Brasil

Telefone: (16) 3301-9740

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

- Mestrado em Química:

UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP

Período: 2017 – 2019

Título da dissertação: Desenvolvimento, otimização e aplicação de sensor biomimético com tradução óptica seletivo ao corante verde ácido 16

Bolsa: CAPES

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Maria del Pilar Taboada Sotomayor

- Bacharelado em Química:

UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP

Período: 2011 – 2016

Título da monografia: Desenvolvimento de sensores ópticos biomiméticos para determinação de quinolonas

Bolsa: PIBIC – CNPq (Processo nº 471231/2011-8)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Maria del Pilar Taboada Sotomayor

ESTÁGIO DOCÊNCIA:

- Química Analítica Qualitativa:

UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP

Curso: Engenharia Química

Período: 1º semestre de 2018

Supervisoras: Prof.^a Dr.^a. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor e Prof.^a Dr.^a. Mirian Cristina dos Santos

MONITORIA EM DISCIPLINA DE GRADUAÇÃO:

- Química Analítica Qualitativa:

UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP

Curso: Engenharia Química

Período: De 29/02/2016 a 08/07/2016

Supervisoras: Prof.^a Dr.^a. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor e Prof.^a Dr.^a. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS:

- XXVI Congresso de Iniciação Científica UNESP:

Local: UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP

Período: 15 a 16 de outubro de 2014

Apresentação do trabalho intitulado: Caracterização de Polímeros Impressos visando o desenvolvimento de Sensores Ópticos Biomiméticos para determinação da ciprofloxacina

Autores: Bianca Mortari e Maria del Pilar Taboada Sotomayor

- XXIII Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica:

Local: Cusco, Peru

Período: 3 a 8 de junho de 2018

Apresentação do trabalho intitulado: Avaliação do polímero biomimético como plataforma sensora seletiva para quantificação do corante verde ácido 16

Autores: Bianca Mortari, Sabir Khan e Maria del Pilar Taboada Sotomayor

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS:

- 1ª Escola de Verão em Química:

Local: UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP

Período: 26 de fevereiro a 2 de março de 2018

Colaboradora do minicurso: Contribuições da Eletroanalítica nas áreas de energia, saúde e meio ambiente

- Mulheres na Ciência 2015: Desafios e Atalhos para o Sucesso:

Local: UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP

Período: 10 de agosto de 2015

- 44ª Semana da Química:

Local: UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP

Período: 13 a 17 de outubro de 2014

Participação do minicurso: "Astroquímica e astrobiologia" com duração de 12 horas

Dedicatória

Dedico a minha mãe Marli e meu falecido pai Antônio, e também a toda minha família e amigos que me deram apoio durante esses anos. Dedico ao meu namorado Felipe, por todo amor e carinho. E aos meus orientadores e professores que me guiaram nessa caminhada.

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.”

(Ayrton Senna da Silva)

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

(Isaac Newton)

“Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência.”

(Santo Agostinho)

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

(Marie Curie)

AGRADECIMENTOS

À Deus, principalmente, por ter permitido estar onde estou agora e ter realizado todas essas conquistas, por me ajudar a me manter forte nessa caminhada.

À minha mãe Marli, por todo apoio e carinho nesses anos de estudo e todos os dias de minha vida, inclusive nos dias difíceis. Ao meu falecido pai Antônio, que me ensinou a importância de se esforçar e tentar várias vezes a ir atrás dos meus objetivos e todo seu legado deixado. Aos meus tios Maria e Alexandre por terem me acolhido no lar deles durante todos esses anos da minha vida acadêmica.

À toda minha família e parentes que me acompanharam e apoiaram nessa caminhada: meu irmão, minha cunhada, meus tios e primos e todos os parentes que me ajudaram e apoiaram. Aos meus amigos de Santa Ernestina e de outras cidades que me proporcionaram bons momentos e companheirismo.

Ao meu namorado Felipe, por todo apoio, amor e carinho compartilhado nesses anos, nos meus dias bons e nos meus dias difíceis. E também a sua família pela ajuda e pelo suporte.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a. Maria del Pilar Taboada Sotomayor, por todo o ensinamento e todos os conselhos dados, pelas oportunidades oferecidas e toda a paciência, amizade e dedicação. Pois não somos e nem aprendemos nada sem nossos professores.

Ao meu co-orientador Dr. Sabir Khan, por toda paciência e cuidado que teve comigo durante meus estudos e trabalhos. Pelos momentos alegres e difíceis, pela amizade e pelo apoio.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, principalmente companheira do grupo GEAR, pelo companheirismo e pelos bons momentos que passamos juntos. Pelas inúmeras ajudas que recebi para o meu trabalho. Pelos momentos felizes em festas, churrascos e na hora do café.

Aos funcionários do Instituto de Química: no departamento de Química Analítica, na biblioteca e na Sessão Técnica de Graduação e Pós-Graduação, pela ajuda e suporte recebidos.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Ao Instituto de Química da UNESP pela infraestrutura, pelos estudos e conhecimentos, pela experiência adquirida e pela acolhida durante esses anos.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do meu trabalho.

“Que o teu trabalho seja perfeito para que, mesmo depois da tua morte, ele permaneça.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Este trabalho propõe a síntese de MIP usando como molécula molde, ou *template*, o corante Verde Ácido 16 (AG16), um corante do grupo dos trifenilmetanos. A síntese foi feita pelo método em *bulk*; diretamente sobre a fibra óptica, usada como transdutor no desenvolvimento do sensor óptico; e também diretamente em placas de vidro, para fins de caracterização morfológica dos materiais impressos. O polímero sintetizado e o sensor construído foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia vibracional da região no Infravermelho (IV), Reflectância Total Atenuada (RTA) e Microscopia Confocal. Os parâmetros otimizados para o desempenho do sensor foram temperatura, tempo de adsorção/pré-concentração e pH, obtendo-se os melhores resultados a 25 °C, 60 minutos e pH 7,0; respectivamente. Sob estas condições os limites de detecção e quantificação do MIP-sensor foram 62,2 e 188 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, com valores de repetibilidade e reprodutibilidade, em termos do desvio padrão relativo (RSD) abaixo de 4%. Nos experimentos realizados usando o MIP-optodo-AG16 na presença de outros quatro corantes diferentes, os valores de obtidos para a retenção/adsorção desses corantes mostraram a excelente seletividade do *tip*-sensor construído. Na aplicação em amostras de rio e de efluente industrial enriquecidas com AG16, os valores de recuperação obtidos foram próximos a 100% para o MIP-optodo, mostrando a eficiência do sensor em relação ao NIP-optodo. Desta forma, este trabalho de mestrado mostra um sensor óptico inédito na literatura com excelente desempenho e promissor para análise de corantes em efluentes industriais de forma seletiva e confiável.

Palavras Chave: MIP, optodos, sensores químicos à base de fibra óptica, verde ácido 16, sensor biomimético

ABSTRACT

This work proposes the synthesis of a MIP using Acid Green 16 (AG16) dye as template molecule of the triphenylmethane group. The synthesis was made by bulk method directly on the optical fiber surface which is using as a transducer in the development of optical sensor and also synthesized directly on glass plates for morphological characterization of the printed materials. The synthesized polymer and the constructed sensor were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Infrared (IR), Attenuated Total Reflectance (ATR) and Confocal Microscopy. The optimized parameters were temperature, adsorption/pre-concentration time, pH, obtaining the best results at 25 °C, 60 minutes and pH 7,0 respectively. Under these conditions for the MIP-sensor the limits of detection and quantification were 62.2 and 188 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectively, with repeatability and reproducibility values in terms of relative standard deviation (RSD) below 4%. The experiments were performed using MIP-optode-AG16 in presence of four other different dyes and the values obtained for the retention/adsorption of those dyes showed the excellent selectivity of the constructed tip-sensor. For application the river samples and industrial effluent were enriched with AG16 and recovery values were obtained close to 100% for the MIP-optodo that showing the efficiency of the sensor in relation to the NIP-optodo. Thus this master's work shows the development of an exceptional optical sensor for the literature with excellent performance and promising for dye analysis in industrial effluents in a selective and reliable way.

Key words: mip, optical fiber, acid green 16, optode, biomimetic sensor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural básica de um trifenilmetano.	22
Figura 2 - Fórmula estrutural do corante Verde Ácido 16. R = Met ou Et.	23
Figura 3 - Esquema de como funciona uma fibra óptica bifurcada, a luz gerada na fonte atravessa um dos lados, incide na amostra e interage com o analito, modificando o sinal óptico. Depois é refletida e passa pela outra bifurcação e irá para o detector, com as informações para análise.	27
Figura 4 - Ilustração dos dois tipos de reflectância.	28
Figura 5 - Ilustração de como é sintetizado o MIP e gerada a cavidade desocupada.	30
Figura 6 - Espectrofotômetro Uv-Vis, montado e adaptado para medidas de reflectância em fibras ópticas.	36
Figura 7 - Peças e componentes utilizados nas análises: (A) Fibra óptica com MIP, tubo para inserir a fibra e ponta com superfície refletora (espelho); (B) Fibra parcialmente encaixada no tubo; (C) Fibra totalmente encaixada no tubo; (D) Tubo com fibra e a ponta encaixados; (E) Fibra bifurcada encaixada no acoplador; (F) Fibra óptica bifurcada, o lado esquerdo receberá a radiação proveniente do optodo; (G) Suporte acoplador onde entra a luz e é encaixada a fibra bifurcada.	37
Figura 8 - Fotografias esquematizando como se prepara a fibra: à esquerda medindo e cortando no tamanho desejado; à direita durante o processo de silanização.	39
Figura 9 - Fórmula estrutural do agente MPS. A parte circulada em vermelho representa o centro sílico-funcional, enquanto a parte circulada em azul representa o centro orgânico-funcional.	39
Figura 10 - Mecanismo de imobilização do MPS na superfície de vidro.	40
Figura 11 - Comparação entre as estruturas do MPS e do EGDMA. O sítio orgânico-funcional do silanizante é idêntico a uma parte da estrutura do monômero, como está destacado na figura.	40
Figura 12 - Fotografia das placas de vidro antes de serem preparadas.	41
Figura 13 - Fórmulas estruturais do (A) Iniciador Radicalar, (B) Monômero Estrutural e (C) Monômero Funcional.	42
Figura 14 - (A) Processo de adição dos reagentes sob borbulhamento de N ₂ antes a incorporação da fibra. (B) Fotografia do frasco contendo a fibra óptica dentro da câmara úmida (sistema completo).	42

Figura 15 - Ilustração esquematizando a câmara úmida, ela é ambientada com N ₂ e vapor de metanol, não há saída de gases e nem entrada de O ₂ .	43
Figura 16 - Fibras ópticas com MIP/NIP antes e depois da lavagem.	44
Figura 17 - Placas de vidro com MIP/NIP antes e depois da lavagem.	44
Figura 18 - Foto do Barrelinho [®] usado para medir a reflectância de sólidos.	45
Figura 19 - Imagem ilustrativa do microscópio óptico confocal (Olympus).	46
Figura 20 - Ilustração do equipamento utilizado (A). Uma visão mais detalhada da peça onde o optodo é aplicado para realizar as medidas de reflectância (B).	47
Figura 21 – Fórmulas estruturais dos corantes empregados como interferentes com seus respectivos comprimentos de onda.	50
Figura 22 - Espectro de absorção para o corante Verde Ácido 16, em água no UV-Vis.	53
Figura 23 - Imagens MEV dos polímeros MIP e NIP para o corante AG16.	54
Figura 24 - Imagens MEV das fibras ópticas sem os polímeros: Limpa (A) e silanizada (B).	54
Figura 25 - Imagens MEV dos polímeros MIP e NIP na fibra, ampliado em 50x, para o corante AG16.	55
Figura 26 - Imagens MEV dos polímeros MIP e NIP na fibra, ampliado em 5000x, para o corante AG16.	55
Figura 27 - Espectro no Infravermelho do MIP e NIP (sem a fibra) e com o monômero estrutural EDGMA, junto com sua estrutura molecular.	56
Figura 28 - Espectro no Infravermelho do MIP e do corante AG16.	57
Figura 29 - Espectro das fibras limpa e silanizada, junto com as estruturas da sílica (A) e do MPS (B).	58
Figura 30 - Espectro no infravermelho das fibras com MIP e NIP.	59
Figura 31 - Fotografia dos tubos de eppendorfs [®] que contêm os polímeros interagindo com o corante.	60
Figura 32 - Espectros de reflectância na região UV-Vis dos polímeros soltos utilizando o Barrelinho [®] .	61
Figura 33 – Comparação da variação da reflectância das curvas do MIP e NIP obtidas por RTA e derivadas da Figura 32.	62
Figura 34 - Imagens do MIP extraídas de experimentos realizados no Barrelinho [®] com variação na concentração de 5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.	63

Figura 35 - Imagens do NIP extraídas de experimentos realizados no Barrelino® com variação na concentração de 5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	63
Figura 36 - Imagem tridimensional obtida com o microscópio óptico confocal com aumento de 100 vezes da superfície dos polímeros (MIP e NIP) (A) e uma imagem representativa da análise da rugosidade superficial de MIP(A) e NIP (B).....	64
Figura 37 - Espectros de reflectância na região UV-Vis para diferentes tempos do corante AG16 dissolvido em água empregando a fibra óptica modificada com MIP e NIP, para monitoramento. As análises foram realizadas em 10,0 mL de solução contendo 0,6 mmol L^{-1} de corante.....	66
Figura 38 - Curvas da reflectância em função do tempo, a 640 nm. Dados extraídos da Figura 37.....	67
Figura 39 - Espectros de reflectância do corante AG16 dissolvido em água, na região UV-Vis para diferentes temperaturas empregando o MIP-optodo e o NIP-optodo para monitoramento.	68
Figura 40 - Comparativo das duas curvas de temperatura dos polímeros. Gráfico obtido com os espectros da Figura 39.	69
Figura 41 - Espectro da absorção do corante AG16 na região do UV-Vis, em água e medido em temperaturas diferentes.....	70
Figura 42 - Comparativo de todas as curvas analíticas da reflectância em função da concentração em soluções com diferentes valores de pH.....	71
Figura 43 - Comparativo de curvas analíticas do MIP em todos os pH avaliados.....	72
Figura 44 - Estruturas do AG16 em ressonância de acordo com o pH da solução. ..	73
Figura 45 - Espectros de reflectância na região UV-Vis para diferentes concentrações do corante AG16 dissolvido em água empregando a fibra óptica para monitoramento, nas condições previamente otimizadas.	74
Figura 46 - Curva analítica da reflectância em função da concentração a 640 nm (n = 3).	75
Figura 47 - Gráficos da média das 10 reflectâncias em função da concentração junto com o desvio padrão, para cada um dos polímeros.	78
Figura 48 - Gráficos da média das reflectâncias em função da concentração junto com o desvio padrão, para cada um dos polímeros.	80
Figura 49 - Comparativo de todas as curvas analíticas da reflectância em relação à concentração para cada corante com seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorvância.....	81

Figura 50 - Comparativa das curvas analíticas da reflectância em função da concentração do MIP em todos os corantes (A). Comparativo da variação da reflectância entre MIP e NIP de na concentração de 1 mmol L^{-1} (B). 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos parâmetros obtidos nas curvas analíticas dos polímeros MIP e NIP.....	76
Tabela 2 - Valores calculados da média das reflectâncias, desvio padrão e desvio padrão relativo para n = 10.	77
Tabela 3 - Valores calculados das reflectâncias das fibras e as suas médias, desvio padrão e desvio padrão relativo para n = 3.	79
Tabela 4 - Parâmetros relacionados à seletividade do sensor proposto em comparação como o.....	83
Tabela 5 - Tabela com os valores das reflectâncias obtidas das amostras de efluentes.	85
Tabela 6 - Tabela com os valores das Porcentagens de Recuperação para cada amostra de efluente.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MIP: *Molecularly Imprinted Polymer*

NIP: *Non-Imprinted Polymer*

AG16: *Acid Green 16*

UV-Vis: Ultravioleta na região do visível

MM: Molécula molde

MF: Monômero funcional

ME: Monômero estrutural

IR: Iniciador radicalar

SPR: *Surface Plasmon Resonance*

1-VI: 1-vinilimidazol

EGDMA: Etileno-glicol-dimetacrilato

AIBN: 2-2'-azo-bis-(2-metilpropionitrila)

AR1: Acid Red 1

DV51: Direct Violet 51

DY50: Direct Yellow 50

AR114: Acid Red 114

MPS: 3-metacriloxipropiltrimetoxissilano

ATR: Attenuated Total Reflectance

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

FEG-SEM: Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy

FTIR: Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

RSD: Relative Standard Deviation

%R: Reflectância

s: Desvio Padrão

\bar{x} : Média dos valores

α : Fator de Impressão Molecular

β : Fator de Seletividade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Corantes têxteis	20
1.2. Verde Ácido 16	22
1.3. Técnicas de detecção e quantificação	24
1.4. Optodos	25
1.5. Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs)	29
2. OBJETIVO	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Reagentes e soluções.....	35
3.2. Instrumentação	36
3.3. Preparação da fibra	38
3.4. Síntese dos polímeros	41
3.5. Remoção do template do <i>tip</i> -sensor: Etapa de lavagem	43
3.6. Estudos de caracterização	45
3.6.1. Reflectância em sólidos usando Reflectância Total Atenuada (ATR).....	45
3.6.2. Microscopia Confocal.....	45
3.7. Estudos de otimização	46
3.7.1. Protocolo de medidas	46
3.7.2. Estudos de otimização para tempo de interação, temperatura e pH da solução.....	48
3.7.3. Perfil de resposta do sensor em diferentes concentrações de corante	49
3.8. Avaliação da seletividade.....	49
3.9. Aplicação do MIP-optodo em amostras de efluentes e de resíduos industriais	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Características espectrais do corante AG16	52

4.2. Caracterização morfológica dos polímeros e sensores	53
4.2.1. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
4.2.2. Caracterização por Infravermelho com transformada de Fourier	56
4.2.3. Reflectância em sólidos utilizando ATR nos experimentos de adsorção do AG16 ao MIP em pó obtido por <i>bulk</i>	59
4.2.4. Análise em Microscopia Confocal	63
4.3. Estudos de otimização	65
4.3.1. Otimização do tempo de interação entre o analito e o MIP–sensor	65
4.3.2. Efeito da temperatura na interação entre o MIP-optodo e o corante	68
4.3.3. Avaliação do pH de medida	71
4.3.4. Perfil de resposta do sensor em diferentes concentrações de corante	73
4.3.5. Estudos da capacidade de repetibilidade do MIP-optodo.....	76
4.3.6. Estudos da capacidade de reprodutibilidade do MIP-optodo	78
4.3.7. Avaliação da seletividade	80
4.4. Aplicação do MIP-optodo em amostras de efluentes e de resíduos industriais	84
5. CONCLUSÕES.....	88
6. REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Corantes têxteis

As cores representam uma grande importância no dia-a-dia das pessoas, sendo capazes de despertar sentimentos e emoções quando presente no ambiente e nos objetos, além de serem umas das mais importantes características no meio artístico [1]. As pesquisas sobre os corantes e pigmentos têm atraído a atenção de diversos pesquisadores, sejam eles, filósofos, artistas e cientistas, eles defendem que as cores possuem um grande potencial em influenciar o comportamento dos seres humanos [2]. Os corantes se diferenciam dos pigmentos principalmente por serem solúveis em água e terem uma variedade muito maior de substâncias. Geralmente os corantes são usados na tintura de tecidos, enquanto os pigmentos são mais utilizados para tintas e materiais de construção [1].

A busca pela obtenção de corantes tem sido estudada desde o período neolítico, com vasta e rica diversidade de fontes naturais como plantas e seus componentes, pedras, minérios, fungos e alguns animais [3]. No Egito Antigo, muitos tecidos encontrados em múmias eram coloridos e possuíam corantes naturais como o índigo azul e o vermelho de alizarina, ambos obtidos a partir de plantas. No Brasil durante a época colonial, a árvore pau-brasil chamou a atenção dos portugueses graças ao seu tronco avermelhado, sendo esse a fonte natural de um corante chamado brasilina, que foi amplamente utilizado na época [4].

Corantes naturais provenientes de animais eram mais complexos de se obterem devido ao baixo rendimento. O corante púrpura, por exemplo, era obtido a partir de moluscos do mediterrâneo do gênero *Murex* e *Purpura*. Eram necessários aproximadamente 9000 moluscos para obter cerca de 1 g desse corante, o que tornava o corante extremamente caro e, por isso, essa cor já foi associada à realeza e ao alto clero [5].

Apesar dos corantes naturais possuírem uma ampla variedade de fontes, a sua extração e obtenção era lenta e complexa, além de outras dificuldades. Mas foi a partir do século XIX que começou a preparação de corantes sintéticos, graças ao trabalho do químico britânico Willian Henry Perkin (1838-1907), que, em uma

tentativa falha de sintetizar a quinina (um medicamento para a malária), acabou produzindo um corante de cor púrpura, que foi denominado de malva ou mauveína, o primeiro corante sintético produzido. A partir dessa descoberta, iniciou-se um grande avanço na indústria e nas pesquisas de corantes, sendo que, mais corantes sintéticos foram sendo produzidos com o passar dos anos [6].

Atualmente, a produção de corantes sintéticos compõe cerca de 90% da produção total de corantes, e a quantidade tende a aumentar devido ao crescente interesse por produtos coloridos, além disso, os corantes sintéticos possuem uma capacidade tintorial maior, além de um melhor rendimento e estabilidade em relação aos corantes naturais, essas vantagens incentivam ainda mais as linhas de pesquisa de corantes artificiais [7,8].

A indústria produz entre 700 mil e 1 milhão de toneladas de corantes sintéticos por ano em todo o mundo [9]. Eles são aplicados em uma ampla variedade de setores, como o tingimento de todos os tipos de tecidos, alimentos, plásticos, ceras, fotografias coloridas, papéis, produtos farmacêuticos, cosméticos, entre outros produtos industrializados [7,9].

A principal característica dos corantes é a sua habilidade de absorver e refletir luz na região do visível, o que envolve processos físicos. Os corantes, em sua ampla variedade, podem ser classificados de duas maneiras, uma é pelos grupos funcionais em sua estrutura química, e a outra é pela forma de aplicação [1].

Segundo a primeira classificação, a coloração se baseia na presença de grupos cromóforos em suas estruturas, que promovem transições eletrônicas na região de comprimentos de onda da radiação visível [10], podendo ser devido a sistemas conjugados de duplas ligações ($\pi \rightarrow \pi^*$) ou transições ($n \rightarrow \pi^*$), estas últimas principalmente provenientes de grupos auxocromos, têm a capacidade de promover um efeito batocrômico (deslocamento do comprimento de onda para valores maiores) e hiperacrômico (aumento da intensidade de absorção), modificando as bandas de absorção e a intensidade da cor [1]. Dentre os cromóforos mais comuns têm-se o metino ($-\text{CH}=\text{}$), o azo ($-\text{N}=\text{N}-$), a carbonila ($-\text{C}=\text{O}$), o nitro ($-\text{NO}_2$), a antraquinona, anéis heterocíclicos e corantes poliméricos. Já os auxocromos correspondem aos substituintes com função de doador de elétrons como as aminas, carboxilas, sulfonatos e hidroxilas, mas também existem os antiauxocromos, que são receptores de elétrons, tais como CO_2H e NH_3^+ [10]. Quanto à classificação pelo

método de aplicação têm-se, por exemplo, os corantes ácidos, diretos, reativos, azóicos, dispersivos, a cuba, de enxofre, pré-metalizados e branqueadores [3,11].

1.2. Verde Ácido 16

Dentre os corantes classificados como ácidos, existe um tipo especial que são os trifenilmetanos, nos quais são caracterizados basicamente por um átomo de carbono central ligado a três radicais arila, como é mostrado na Figura 1.

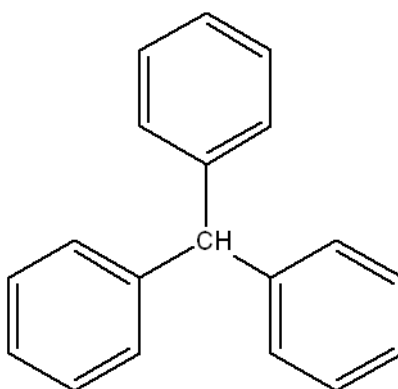


Figura 1 – Fórmula estrutural básica de um trifenilmetano.
Fonte: Autora do trabalho.

Esse tipo de estrutura possui uma ampla variedade de corantes derivados, geralmente eles vêm acompanhados de grupos auxocromos como os sulfônicos e os amino, o que lhes permitem uma boa estabilidade e solubilidade em água [12]. Essa classe de corantes é uma das mais produzidas mundialmente e costuma ser aplicada na indústria têxtil para o tingimento de tecidos como nylon, lã, seda, algodão e couro, além de outros tipos de materiais como papel, plástico, óleos e ceras [13].

O Verde Ácido 16 (Acid Green 16, AG16; C.I. 44025), é um corante pertencente a esse grupo, sendo largamente utilizado na indústria têxtil principalmente na tintura de lã e seda, assim como é também utilizado para impressão. É caracterizado por um pó verde escuro que se solubiliza em água (adquirindo uma coloração azul esverdeada) e em etanol (adquirindo uma cor verde) [14]. Sua fórmula empírica é $C_{31}H_{33}N_2NaO_6S_2$ e a nomenclatura IUPAC é N-[4-[[4-

(Dietilamino)fenil[(3,6-disulfo-1-naftalenil)metileno]-2,5-ciclohexadien-1-ilideno]-N-etiletanamínio [15]. A estrutura molecular é apresentada na Figura 2.

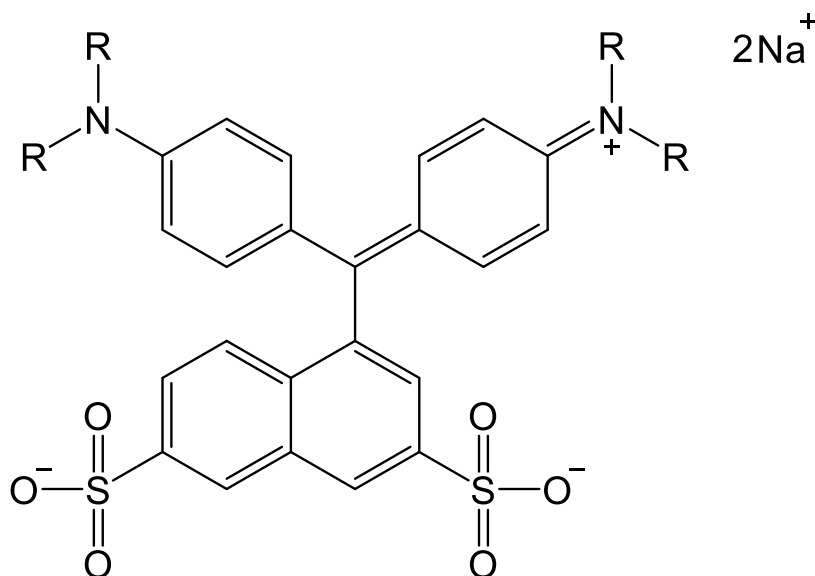


Figura 2 - Fórmula estrutural do corante Verde Ácido 16. R = Met ou Et.
Fonte: Sigma-Aldrich®.

Nas indústrias têxteis, cerca de metade dos corantes utilizados é perdida durante o tingimento do tecido e entre 10 e 15% dessas perdas acabam sendo despejados no meio ambiente, o que faz com que se tornem um grave problema ambiental, visto a enorme produção de corantes em escala mundial. Ao descartarem esses corantes de modo indevido nos efluentes, eles acabam interferindo em processos biológicos de plantas e animais, pois formam espumas na superfície e bloqueiam a luz, impedindo a fotossíntese e diminuindo a quantidade de oxigênio produzido, além disso, são permanentes e altamente tóxicos [9].

A maioria dos corantes sintéticos são carcinogênicos e mutagênicos, tanto em animais quanto em seres humanos, causando diversos problemas respiratórios e alérgicos como irritação na pele e nos olhos [16]. Essa característica toxicológica se aplica também aos trifenilmetanos, os quais são um dos tipos mais comuns de poluentes orgânicos. No caso do AG16, estudos toxicológicos mostraram que esse corante apresentou efeitos genotóxicos e mutagênicos em ratos [17].

É importante que haja tratamentos para remoção de efluentes têxteis e estratégias para impedir a sua contaminação no meio ambiente. Na indústria têxtil, utiliza-se diversas técnicas de tratamento para remoção dos resíduos, técnicas fundamentadas em coagulação, seguido de separação por sedimentação ou flotação

apresentam uma elevada eficiência na remoção do material particulado. No entanto, essa técnica não consegue ter o mesmo desempenho na remoção total dos compostos orgânicos dissolvidos. Existe a técnica de remoção por adsorção de carvão ativo, que é bem mais eficiente, porém, é limitada para os corantes de caráter catiônico, uma vez que a superfície dos carvões é positiva. Outro problema é que essas técnicas de separação não são destrutivas, o que faz com que haja resíduos sólidos que também precisam ser degradados. Nesse caso, há a utilização de processos biológicos baseados em lodo ativado para metabolização de compostos orgânicos, o problema desse tratamento é a limitação devido à composição do efluente e a grande produção de lodo. Em geral, o processo de tratamento na indústria têxtil está fundamentado na operação de sistemas físico-químicos de coagulação-precipitação, seguidos de tratamento biológico por lodo ativado. Esse tipo de tratamento é eficiente e remove aproximadamente 80% da carga de corantes [18].

Apesar dos resíduos terem um tratamento eficiente, ainda sim, uma parcela dos corantes acaba sendo descartada no meio ambiente, e boa parte dessas substâncias são extremamente tóxicas, causando sérios riscos aos seres vivos. Portanto, são necessários estudos para poder identificar e quantificar a ocorrência desses poluentes em ambientes aquáticos, afim de que essas substâncias sejam degradadas e seu despejo possa ser controlado.

1.3. Técnicas de detecção e quantificação

Com o decorrer dos anos, foram surgindo diversas técnicas para detecção e quantificação de corantes, há uma enorme linha de pesquisa para esse fim, baseada principalmente em métodos cromatográficos e eletroquímicos. Técnicas de separação são bastante utilizadas em amostras complexas de corantes, destacando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que permite utilizar diversos detectores no UV-Vis, arranjo de detector de diodos (DAD) e a espectrometria de massas (EM) [19].

Existem também as técnicas eletroquímicas com uma ampla variedade de técnicas, entre elas, a amperometria, a voltametria de onda quadrada,

condutometria, potenciometria [20], voltametria de pulso diferencial [21] e espectroscopia de impedância eletroquímica [22].

Outra técnica bastante utilizada para detecção e quantificação de corantes envolve métodos ópticos. A espectroscopia na região do UV-visível tem vantagens de ser relativamente rápida em relação a outras medidas, mas ela possui limitações na detecção, pois há uma dificuldade em detectar e medir um corante específico em meio a uma mistura de outros corantes interferentes. Para solucionar esse problema, são feitas algumas adaptações para aprimorar a seletividade dessa técnica [19]. Uma delas é a ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), que foi desenvolvida em 1971 substituindo ao radioimunoensaio. Essa técnica consiste na interação do analito, como antígeno, um anticorpo de captura de antígeno, além de outro anticorpo de detecção que produz um sinal quando o antígeno ligado ao anticorpo está presente [23].

Mesmo havendo uma diversidade de metodologias para detecção e quantificação de corantes, muitas delas são bastante limitadas devido à necessidade de pré-tratamento de amostras, o que exige um maior tempo de análise, além de terem alto custo e grande consumo de solventes. Por essa razão, muitos estudos realizados recentemente procuram superar essas dificuldades, um deles que ainda é pouco explorado, mas bastante promissor, são os estudos baseados em fibras ópticas, para a construção de optodos [24]. A aplicação desses dispositivos pode se tornar vantajosa, uma vez que os corantes apresentam propriedades químicas de absorver luz na região do visível, possibilitando o monitoramento por medidas de cor através da absorbância ou reflectância difusa. E essa característica ainda pode ser aperfeiçoada com a adição de um elemento reconhecedor para ampliar a seletividade de um analito específico em meio a uma amostra complexa [19].

1.4. Optodos

De acordo com a IUPAC, um sensor químico é um dispositivo que transforma uma informação química em um sinal analiticamente útil, variando da concentração da amostra até a análise da composição total. Essa informação química pode se originar tanto de uma reação química do analito quanto de uma propriedade física do sistema investigado [25].

Os sensores podem ser divididos em duas classes principais: Sensores físicos, que fornecem informações sobre as propriedades físicas do sistema como pressão, temperatura, massa, radiação, entre outras; e os sensores químicos, que são capazes de transformar a informação química (concentração, composição química, presença de um analito particular, etc.) em um sinal analiticamente útil, esses sensores são capazes de interagir seletivamente com substâncias específicas, os analitos, para sua identificação e quantificação [25,26].

No caso dos sensores químicos, eles são divididos em duas partes importantes: a parte receptora e a transdutora. Na parte transdutora, a energia química contida na amostra é transformada em um sinal óptico analiticamente útil, porém, essa parte não apresenta seletividade. Já a parte receptora é o componente-chave do sensor, pois é capaz de permitir a seletividade de um analito em uma mistura de outras substâncias, evitando assim, interferentes [25].

Os sensores químicos classificam-se de acordo com o princípio de funcionamento do transdutor. Sensores ópticos, em especial, são capazes de transformar radiação eletromagnética em função da concentração do analito para gerar um sinal analítico no transdutor. Eles podem ser subclassificados de acordo com a propriedade óptica que está sendo analisada: absorvância, reflectância, luminescência, fluorescência, fosforescência, entre outras propriedades [25].

Nos últimos anos, as fibras ópticas têm se tornado ferramentas essenciais na detecção de substâncias, sendo uma importante parte na tecnologia de sensores ópticos. Elas são aplicadas em diferentes setores, como no monitoramento ambiental, na medicina, microbiologia, farmacêutica, clínica, industrial, militar, entre outras áreas. São excelentes materiais com longa duração, baixo custo, imunidade à interferência eletromagnética, não exigem um sinal de referência, capacidade de realizar sensoriamento a longas distâncias, facilidade no manuseamento, além de outras vantagens [26,27].

No funcionamento de um sensor óptico, a luz de uma fonte incide na fibra óptica, atravessando por dentro até interagir com a fase sensora contendo o reconhecedor imobilizado na superfície da fibra, sendo sensível e seletivo ao analito em questão, e dependente de sua concentração. Essa interação modifica o sinal óptico de acordo com a natureza química do analito, gerando uma informação desejada; o sinal retorna pela mesma fibra ou por outra, até chegar num detector que irá medir as informações adquiridas. Há também o funcionamento utilizando um

feixe bifurcado de fibras ópticas, em que a luz incidente atravessa por uma das bifurcações, interage com o analito e retorna na outra bifurcação para o detector [28,29]. Esse modo de operação é esquematizado na Figura 3.

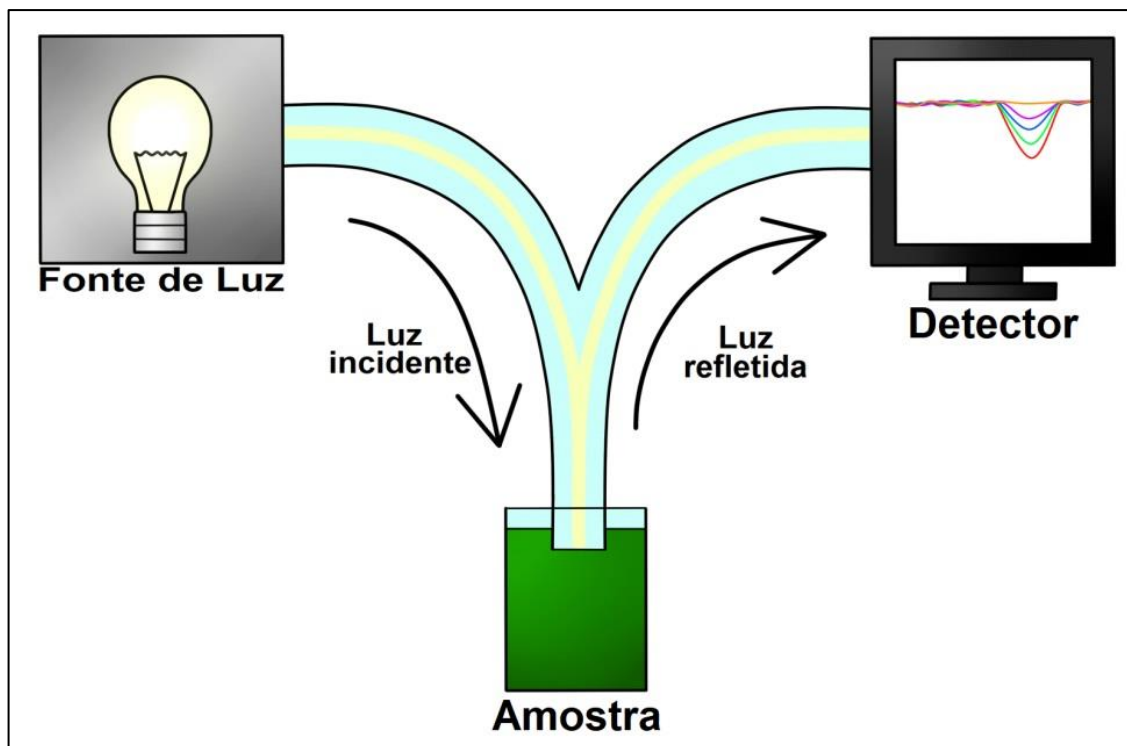


Figura 3 - Esquema de como funciona uma fibra óptica bifurcada, a luz gerada na fonte atravessa um dos lados, incide na amostra e interage com o analito, modificando o sinal óptico. Depois é refletida e passa pela outra bifurcação e irá para o detector, com as informações para análise.

Fonte: Autora do trabalho.

Nesses dispositivos a variação óptica que é monitorada pode ser desde a variação de cor, através de reflectância ou transmitância; até variação do índice de refração, da onda evanescente ou da SPR (ressonância plasmônica de superfície).

No caso de sensores ópticos baseados em variação da refletância, é importante compreender o conceito de reflectância, a qual é a razão entre o fluxo de radiação eletromagnética incidente e o fluxo de radiação refletido, sendo uma grandeza adimensional (Equação 1) e geralmente apresentada em forma de porcentagem [30].

$$\textit{Reflectância} = \frac{\textit{Fluxo de radiação refletido}}{\textit{Fluxo de radiação incidente}} \quad (1)$$

Portanto, através dessa equação, é possível perceber que, se a reflectância (R) for igual a 0, significa que não há reflexão, já se R for igual a 1, significa que toda a radiação foi refletida, ocorrendo o fenômeno da reflectância total, chamada também de reflectância especular [29]. De maneira mais simples de entender, se a reflectância for 100%, significa que toda a radiação incidida foi refletida e não houve absorção de luz, o que indica que não há presença espécies absorvedoras. Mas se essa reflectância for menos que 100%, significa que uma parte da luz foi absorvida pelo material, ocorrendo a reflectância difusa, podendo ser causado pela modificação da superfície, por exemplo, na presença de algum analito. O valor dessa porcentagem vai depender da quantidade do material absorvente e de suas características fotoquímicas [31].

Como anteriormente colocado, quando a radiação é incidida sobre uma superfície, podem ocorrer dois tipos de reflexão: a total, também conhecida como regular ou especular, e a difusa. A reflexão regular ocorre quando há um paralelismo entre raios de incidência e reflexão, ou seja, quando seus ângulos são iguais. Esse tipo de fenômeno ocorre em superfícies lisas e polidas, como os espelhos. No caso da reflexão difusa, os raios de reflexão perdem seu paralelismo, tendo seus ângulos diferentes, isso ocorre em superfícies irregulares [32] e pode ser aproveitada para o monitoramento de analitos nos optodos [33,34]. Os dois tipos de reflectância são ilustrados na Figura 4.

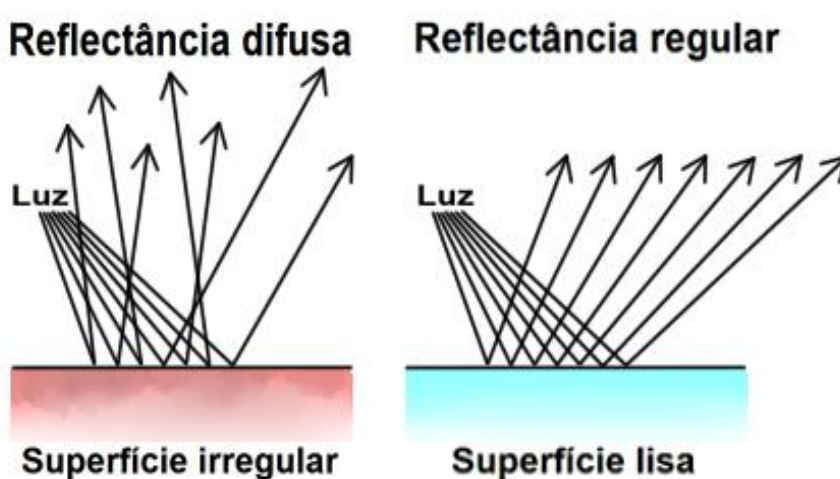


Figura 4 - Ilustração dos dois tipos de reflectância.
Fonte: Autora do trabalho.

A fase sensora do optodo é responsável pela interação com o analito e pela seletividade, por isso, é importante que haja uma imobilização eficiente e durável sobre a superfície da fibra óptica. Existem várias maneiras de se imobilizar uma fase sensora, uma delas é a imobilização via ligação covalente, geralmente é realizada através da silanização utilizando moléculas denominadas agentes silanizantes. Essas moléculas possuem dois centros reativos, um sílico-funcional, que apresenta afinidade com o vidro, e o orgânico-funcional, que apresenta afinidade com a molécula orgânica, que é a fase sensora. Esse método de imobilização garante maior estabilidade e tempo de vida do sensor, além de melhorar a resposta analítica do optodo [19,35].

Sensores a base de fibra óptica permitem uma ampla aplicação na química analítica, com destaque para as áreas ambiental, alimentícia, clínica e em processos industriais. Podendo ser obtidos dispositivos de baixo custo e com facilidade de fabricação, imunidade à interferência elétrica e eletromagnética, com boa seletividade e sensibilidade, possibilidade de análise em tempo real, além de serem descartáveis [35,36].

Há uma grande diversidade de materiais que atuam como fase sensora e se combinam com as fibras ópticas para otimizar sua sensibilidade. Nos últimos anos, os MIPs têm se destacado pelas suas características promissoras para atuarem como fase sensora, são polímeros que mimetizam o sistema antígeno-anticorpo, com as vantagens de serem mais resistentes e mais baratos do que os sistemas biológicos.

1.5. Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs)

Nos últimos anos, tem sido proposta uma metodologia promissora e mais simples para extração e/ou pré-concentração de diversos analitos baseada em materiais altamente seletivos. Esses materiais conhecidos como Polímeros Molecularmente Impressos (*Molecularly Imprinted Polymers – MIPs*) apresentam diversas vantagens como seletividade, durabilidade e baixo custo. São esses polímeros que na construção de sensores podem atuar como fase sensora e podem se combinar com diversos transdutores como as fibras ópticas, possuindo um

reconhecimento altamente seletivo, graças à formação de cavidades seletivas à forma e o tamanho de um analito específico. Esses materiais se assemelham a um sistema “antígeno-anticorpo”, em que o analito pode ser considerado como “o antígeno” e o MIP como o “anticorpo”, semelhante ao que ocorre nos sistemas biológicos dos organismos vivos, sendo desta forma, considerados como anticorpos plásticos ou também chamados de polímeros biomiméticos [37].

Na síntese e polimerização dos MIPs, uma molécula molde (o analito) é impressa de maneira que uma cavidade polimérica é formada em volta desse analito. Após a formação, o polímero é lavado para a remoção do analito remanescente, geralmente é utilizado o sistema *soxhlet* para realizar essa lavagem, para então, obter a cavidade seletiva do MIP, que contém os sítios ativos complementares à forma e tamanho do analito de interesse. Após a lavagem, o polímero limpo terá nano cavidades com tamanhos uniformes capazes de reter seletivamente o analito em meio a uma amostra complexa [38]. A Figura 5 esquematiza como é feita a síntese do MIP.

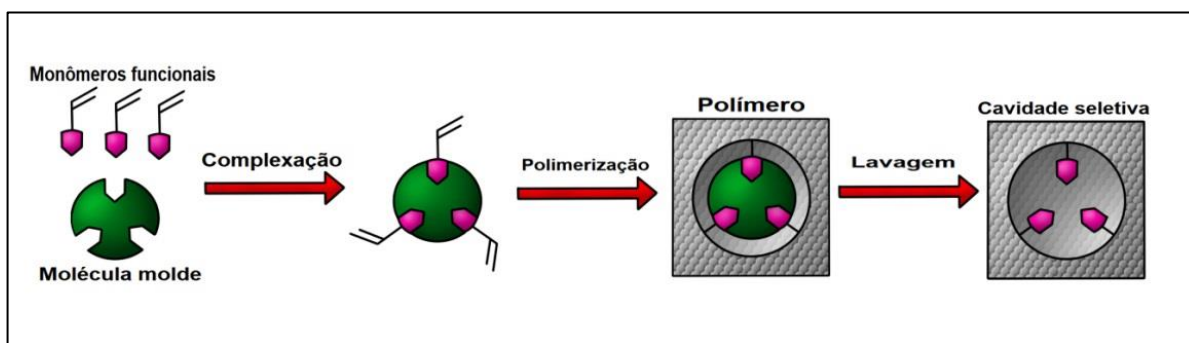


Figura 5 - Ilustração de como é sintetizado o MIP e gerada a cavidade desocupada.
Fonte: Autora do trabalho.

A polimerização envolve diferentes etapas: Primeiramente, em um sistema simples e homogêneo, a *molécula molde* ou *analito* interage com o *monômero funcional* (MF), o qual contém grupos funcionais para interagir com o analito e, posteriormente, gerar os sítios ativos do MIP, essa interação forma um complexo denominado molde-monômero. Em seguida será adicionado o *monômero estrutural* (ME) responsável pela estabilidade mecânica do MIP e principal componente da matriz polimérica. Finalmente é adicionado o *iniciador radicalar* (IR), que irá dar início a polimerização, quando o radical ataca as ligações duplas dos monômeros. Há também a utilização de um solvente porogênico, que precisa ser selecionado de

modo que não interaja com nenhum dos componentes da polimerização, para não interferir na síntese do MIP, além desses componentes serem solúveis no solvente escolhido. Depois que o polímero é formado, a molécula molde deverá ser extraída da cavidade polimérica, assim como outros reagentes remanescentes, utilizando um solvente orgânico de lavagem que possa solubilizar o analito e removê-lo da matriz polimérica, esse solvente pode ser uma substância pura ou uma mistura [39].

Com a remoção do analito e outros reagentes, são reveladas as cavidades do MIP, que apresentam forma e tamanho complementares ao analito de interesse. O solvente de lavagem é removido por evaporação e o polímero impresso estará pronto para realizar estudos de religação com a molécula alvo [39].

Existem também os polímeros não impressos (*Non Imprinted Polymers – NIPs*), que são sintetizados semelhantemente aos MIPs, com a diferença de que não há presença de molécula molde para ser impressa, ou seja, o polímero não possui cavidades definidas. A principal função dos NIPs é para estudos de comparação usando como um material de controle [40].

A síntese do MIP pode ser realizada em diversas maneiras, uma delas é a metodologia em *bulk*, que é a mais comum e popular devido à sua simplicidade em polimerizar num sistema homogêneo. Esse procedimento produz um sólido quebradiço com partículas de tamanhos diferentes, para o qual será necessário moagem e peneiramento para obter partículas de tamanho de interesse [41]. Há também outros tipos de sínteses do MIP, como a polimerização por precipitação e por suspensão [37].

Em relação aos componentes utilizados no processo de polimerização, a molécula molde (MM) tem uma grande importância na síntese do MIP, pois ela é responsável pela organização espacial dos grupos funcionais dos monômeros. O monômero funcional (MF) apresenta a função de interagir com os sítios ativos da molécula molde, onde se estabelecem nos locais de reconhecimento molecular e aumentam a seletividade das cavidades formadas, eles podem apresentar caráter ácido, básico ou neutro [42].

Os monômeros estruturais (ME) são os principais componentes da estrutura de matriz polimérica, possuindo a função de controlar a morfologia dessa matriz e conferir sua estabilidade mecânica. Além disso, eles estabilizam os locais de ligação com a capacidade de reconhecimento molecular [43]. Esses compostos devem interagir de maneira estável com os monômeros funcionais para a formação da

estrutura das cavidades poliméricas, pois sua forma e sua quantidade apresentam uma grande influência na seletividade do MIP [44,45].

O iniciador radicalar tem a função de liberar radicais livres para dar início à reação de polimerização. Para que isso aconteça, é preciso haver um estímulo físico para a quebra da estrutura molecular, como aumento da temperatura e a radiação UV [44]. O solvente da reação precisa ser escolhido com cuidado, uma vez que ele precisa dissolver todos os reagentes da síntese, além de não poder interferir nem na complexação do analito com o monômero funcional e nem no processo de polimerização [37].

E finalmente, existe outra condição importante na síntese do MIP, que é garantir a ausência de oxigênio durante a polimerização, pois ela é inibida pela presença desse gás através dos radicais livres. Para poder remover o oxigênio dissolvido, é necessário o borbulhamento de um gás inerte no meio reacional antes do início da polimerização, como o nitrogênio ou o argônio [46].

Nos últimos anos, as pesquisas relacionadas a esses polímeros vêm aumentando significativamente, pois eles têm demonstrado grande potencial devido à sua capacidade de reconhecimento seletivo de diversas moléculas e uma ampla variedade de aplicação em amostras diferentes. Adicionalmente, apresentam boa durabilidade, sendo capazes de serem armazenados por vários anos sem perder sua eficiência, além de poderem ser sintetizados em uma diversidade de formatos (partículas sólidas, core@shell, filmes, entre outros). Por outro lado, a rapidez e facilidade, na síntese, junto com o baixo custo, tornam estes materiais mais vantajosos que seus análogos biológicos (anticorpos), que são mais dispendiosos e difíceis de obter, envolvendo considerações éticas pelo uso de animais. Além disso, os MIPs são mais resistentes a ambientes adversos a sistemas biológicos, como são meios ácidos ou alcalinos, alta pressão e temperatura [47]. Todas estas características evidenciam a potencialidade dos MIP, e justificam o avanço na popularidade destes materiais nas diversas áreas do conhecimento, nos últimos anos.

Com todas as vantagens que esses polímeros possuem, vale ressaltar que eles ainda são capazes de se combinar com diferentes transdutores para permitir a detecção através da construção de sensores. No caso das superfícies transdutoras, tal como explicado anteriormente, os MIPs podem se combinar com as fibras ópticas para formar os sensores químicos à base de fibras ópticas ou optodos [48,49].

Nesse trabalho pretende-se construir um sensor óptico com o MIP imobilizado covalentemente sobre a superfície de fibra óptica de vidro, no qual atuará como fase de reconhecimento seletivo e ao mesmo tempo permitirá a pré-concentração e extração do analito diretamente de amostras complexas na superfície do sensor, conferindo alta sensibilidade aos dispositivos construídos, além de garantir durabilidade e reprodutibilidade.

2. OBJETIVO

O objetivo desta dissertação é o desenvolvimento e otimização de um MIP-optodo para o corante Verde Ácido 16, através da síntese do polímero impresso diretamente sobre a superfície da fibra óptica de vidro silanizada, para sua posterior aplicação em amostras reais de interesse ambiental.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e soluções

Durante o período de desenvolvimento do projeto, para a síntese do MIP que foi realizada pelo método *bulk*, foram utilizados os seguintes reagentes: o corante Verde Ácido 16 (Acid Green 16 – $C_{58}H_{58}N_4Na_2O_{12}S_4$) como molécula molde (template); 1-vinilimidazol (1V) como monômero funcional; etileno-glicol-dimetacrilato (EGDMA) como monômero estrutural; 2-2'-azo-bis-(2-metilpropionitrila) (AIBN) como iniciador radicalar; todos esses reagentes foram fornecidos pela Sigma-Aldrich[®]. O metanol foi utilizado como solvente porogênico, sendo fornecido pela J.T. Baker[®], e também foi utilizado como solvente de lavagem (para limpeza e remoção do analito no MIP) junto com o ácido acético glacial (Neon[®]). Toda água utilizada durante os experimentos foi deionizada, obtida através do sistema Milli-Q Ultra Pure Water System, da marca Millipore[®].

Para os estudos de seletividade, utilizaram-se quatro corantes: Vermelho Ácido 1 (AR1), Violeta Direto 51 (DV51), Amarelo Direto (DY50) e Vermelho Ácido 114 (AR114), todos fornecidos pela Sigma-Aldrich[®].

Para limpeza das fibras ópticas, foi utilizada uma solução aquosa a 1% (v/v) de ácido nítrico (65% m/v fornecido pela Qhemis[®]). No processo de silanização das fibras de vidro, foi utilizado o 3-metacriloxipropiltrimetoxissilano (MPS) como agente silanizador e fornecido pela Sigma-Aldrich[®], junto com o solvente tolueno fornecido pela Neon[®].

Para o controle do pH nas soluções do corante, foram utilizados ácido clorídrico (HCl) 37% e hidróxido de sódio (NaOH) em lentilhas, ambos fornecidos pela Neon[®]. Também foi feita uma solução tampão fosfato utilizando os sais fosfato de sódio monobásico monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), fornecido pela Vetec[®], e fosfato de potássio bibásico anidro (K_2HPO_4), fornecido pela Synth[®].

3.2. Instrumentação

Para a obtenção dos espectros de reflectância, foi usado um espectrofotômetro UV/Vis da Agilent® Technologies modelo Cary 60, com adaptador específico para uso com fibras ópticas e controlado pelo software Scan Cary WinUV®. Adicionalmente, medidas de reflectância difusa atenuada (ATR) em sólidos foram realizadas no modulo específico, denominado Barrelinho, do mesmo equipamento. Foram usadas como “*tip sensor*” fibras ópticas de sílica de 1 mm de diâmetro e 42 mm de comprimento fornecida pela Thorlabs®, esse tamanho foi escolhido por ser ideal em encaixar no equipamento. Estes *tip* sensores foram acoplados a um feixe bifurcado de fibras ópticas da Agilent® adquirido junto com o equipamento, através de um adaptador desenhado especialmente para esta função (Figuras 6 e 7).

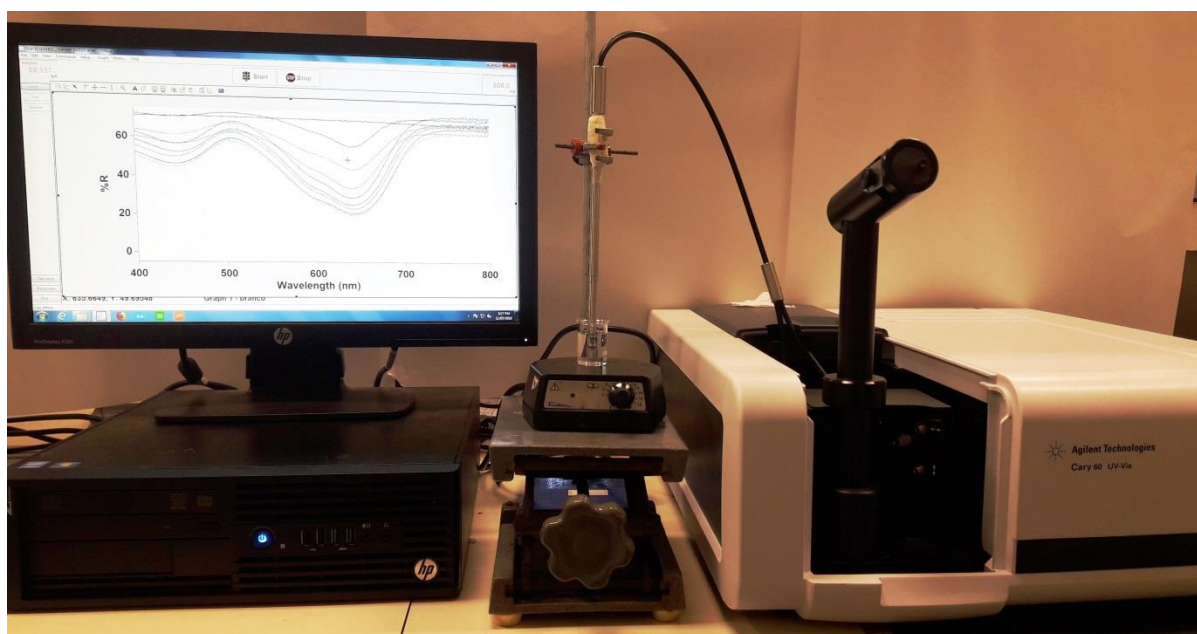


Figura 6 - Espectrofotômetro Uv-Vis, montado e adaptado para medidas de reflectância em fibras ópticas.

Fonte: Autora do trabalho.

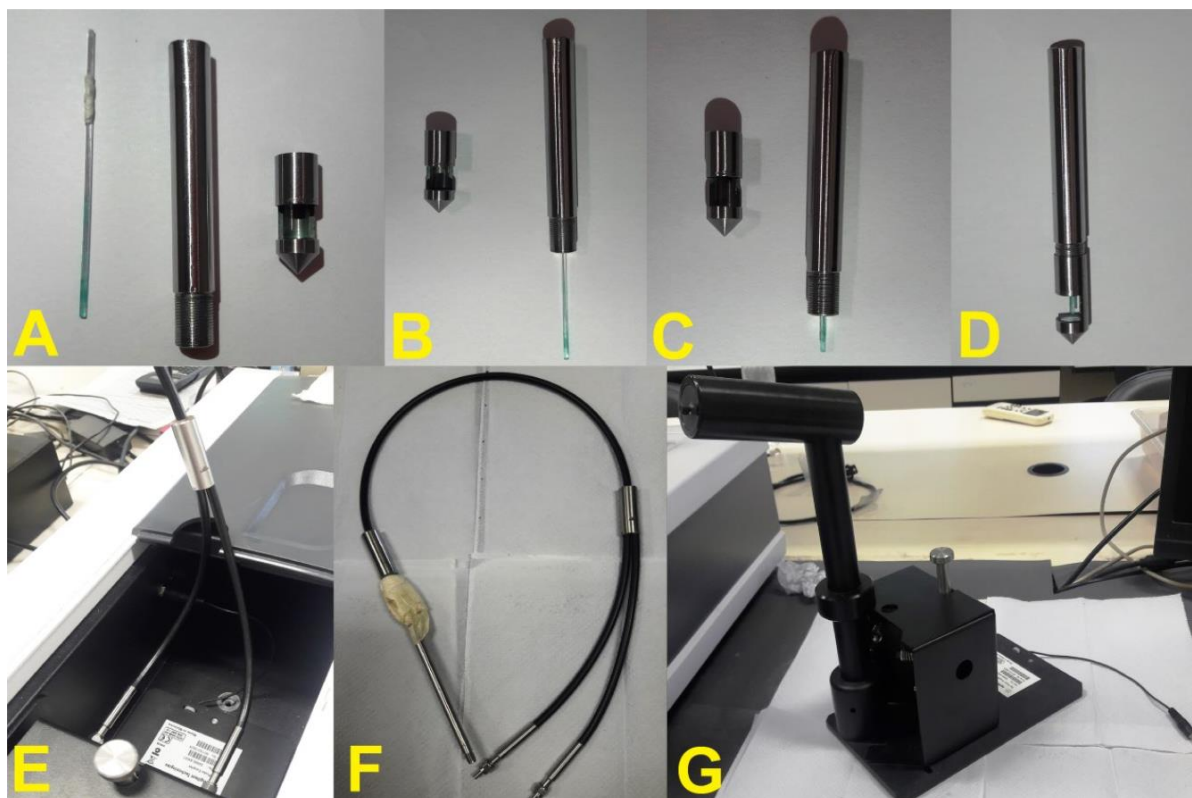


Figura 7 - Peças e componentes utilizados nas análises: (A) Fibra óptica com MIP, tubo para inserir a fibra e ponta com superfície refletora (espelho); (B) Fibra parcialmente encaixada no tubo; (C) Fibra totalmente encaixada no tubo; (D) Tubo com fibra e a ponta encaixados; (E) Fibra bifurcada encaixada no acoplador; (F) Fibra óptica bifurcada, o lado esquerdo receberá a radiação proveniente do optodo; (G) Suporte acoplador onde entra a luz e é encaixada a fibra bifurcada.

Fonte: Autora do trabalho.

Utilizaram-se dois agitadores diferentes durante os experimentos; um agitador simples da marca Fisatom[®] modelo 751; e um com segunda função de aquecimento da marca Kasvi[®] modelo K40-1820H.

Para caracterização das fibras e dos polímeros sintetizados, foram realizadas análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, empregando um espectrofotômetro Vertex 70 da Bruker com detector DLaTGS, na faixa de leitura de 400 a 4000 cm^{-1} .

A morfologia e a caracterização da superfície dos polímeros e dos *tip*-sensores foram observadas por meio de um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução com fonte de elétrons por emissão de campo (FEG-SEM) Jeol JSM 6330F.

Para homogeneização das soluções, foram usados um equipamento de ultrassom da Unique[®] modelo USC-1850A e/ou um homogeneizador de amostras da marca Norte Científica[®] modelo NH 2200.

Na síntese dos polímeros impressos, foi utilizado um banho-Maria SOLAB modelo SL 150/10. O nitrogênio utilizado na reação foi fornecido pela Air Liquide[®]. O pH foi ajustado com um pHmetro da marca Sensoglass[®] modelo SP1800. A separação de sólidos do sobrenadante foi realizada com uma centrífuga da marca Kasvi[®] modelo Speedx1000.

Um microscópio óptico confocal configurado com um laser de 405 nm (Confocal Laser Scanning Microscope – FV3000) foi utilizado para avaliar a rugosidade e espessura da superfície de polímeros (MIP e NIP).

3.3. Preparação da fibra

Primeiramente, as fibras ópticas foram cortadas utilizando uma lâmina de rubi com um comprimento de 42 mm e polidas nas extremidades utilizando uma lixa de tamanho P180, de modo que as superfícies ficassem retas, lisas e uniformes (Figura 8). Depois foram lavadas com uma solução contendo 100,0 mL de uma mistura de água e ácido nítrico concentrado a 1%. A solução contendo as fibras foi aquecida até sua total evaporação e, após esse procedimento, as fibras foram deixadas para secar numa estufa.

No processo de silanização, uma parte da fibra foi mergulhada num frasco *vial* de 2,0 mL de capacidade contendo uma solução de 500,0 µL de MPS dissolvido em 1,0 mL de tolueno, deixada sob agitação magnética por 12 horas (Figura 8). Após isso, a fibra é retirada e deixada para secar no ambiente por alguns minutos, para finalmente ser utilizada na síntese do MIP.

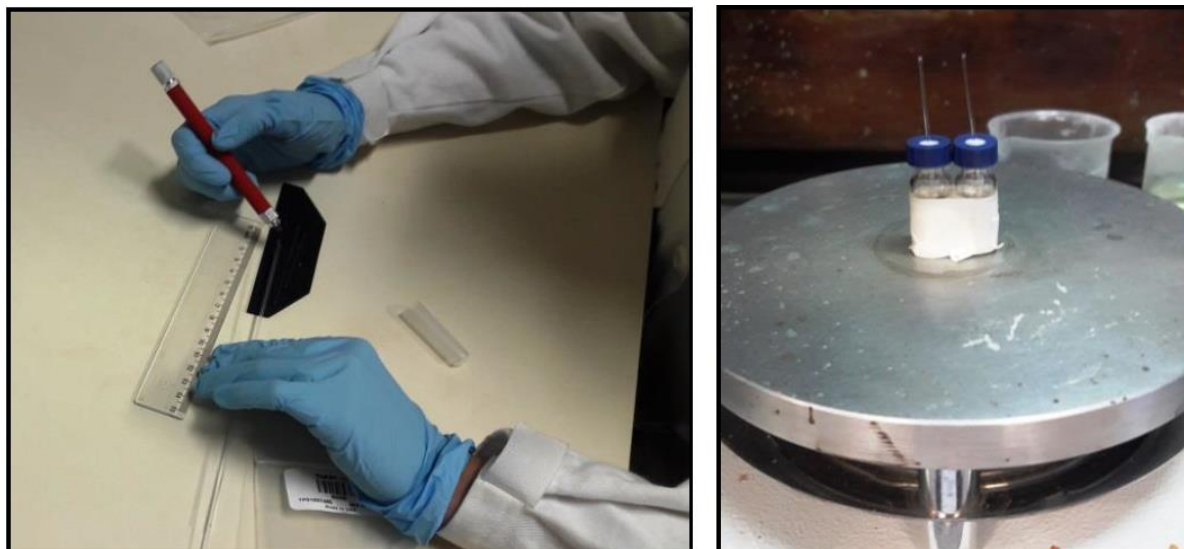


Figura 8 - Fotografias esquematizando como se prepara a fibra: à esquerda medindo e cortando no tamanho desejado; à direita durante o processo de silanização.

Fonte: Autora do Trabalho.

Para entender como funciona o tratamento da superfície da fibra de vidro pelo processo de silanização, primeiramente, é preciso ter em mente como é a fórmula estrutural do MPS, mostrado na Figura 9. Como foi explicado anteriormente, o agente silanizante tem dois centros reativos, o sílico-funcional que irá interagir com a superfície da fibra, e o orgânico-funcional, que irá interagir com as moléculas orgânicas para formar o MIP.

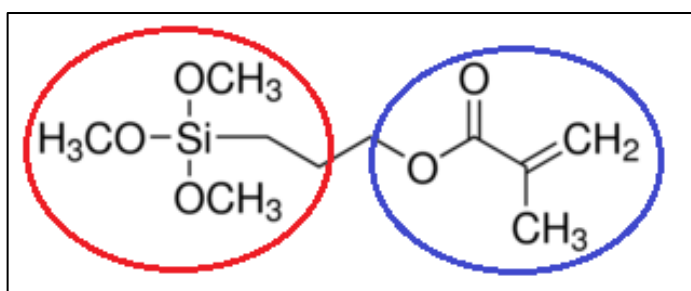


Figura 9 - Fórmula estrutural do agente MPS. A parte circulada em vermelho representa o centro sílico-funcional, enquanto a parte circulada em azul representa o centro orgânico-funcional.

Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440159?lang=pt®ion=BR> [50]

No processo de silanização da superfície de vidro, o mecanismo que ocorre é demonstrado da seguinte maneira: (1) Inicialmente, o átomo de silício do MPS está ligado a três grupos metóxido, enquanto a sílica da superfície de vidro possui grupos $-OH$. Cada ligação entre o metóxido e o silício irá se romper para poder atacar o hidrogênio do metóxido da fibra óptica, resultando em três álcoois metílicos. (2) O

MPS nessa etapa está com o silício de carga positiva (Si^{3+}) e a superfície da fibra está com três oxigênios carregados negativamente (O^-). (3) Finalmente, esses três oxigênios irão atacar o silício em uma única vez, fazendo com que o MPS fique imobilizado na superfície de vidro [51,52], esse mecanismo é explicado na Figura 10.

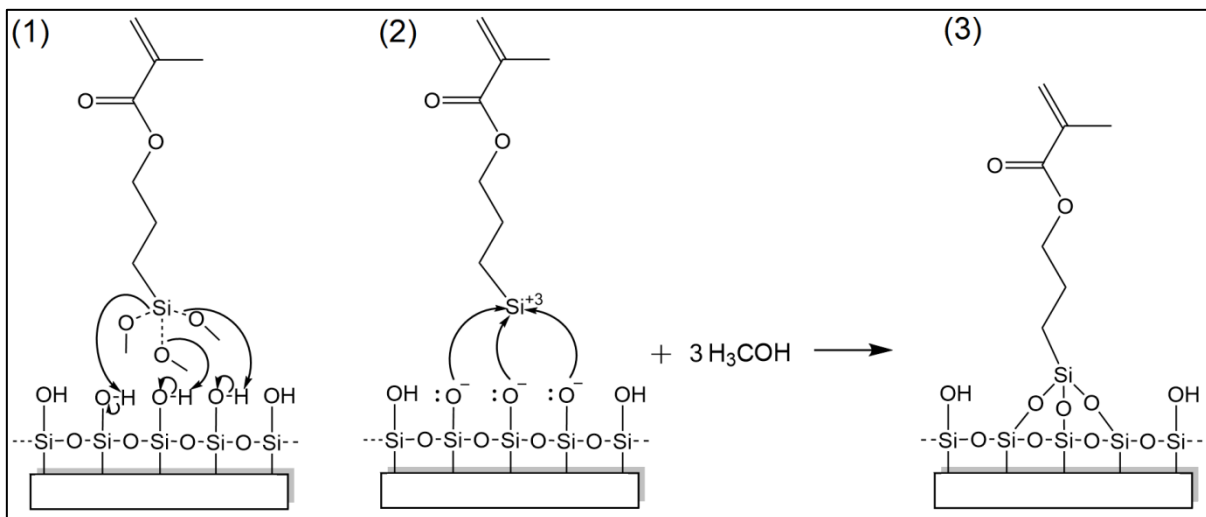


Figura 10 - Mecanismo de imobilização do MPS na superfície de vidro.

Fonte: Autora do trabalho.

Com a etapa da silanização, a superfície da fibra óptica é modificada com a finalidade de poder imobilizar o MIP, onde a parte orgânica-funcional do MPS irá fazer parte da cadeia polimérica, isso porque a estrutura desse sítio é idêntica a uma parte do monômero estrutural, como é mostrado na Figura 11 (em destaque).

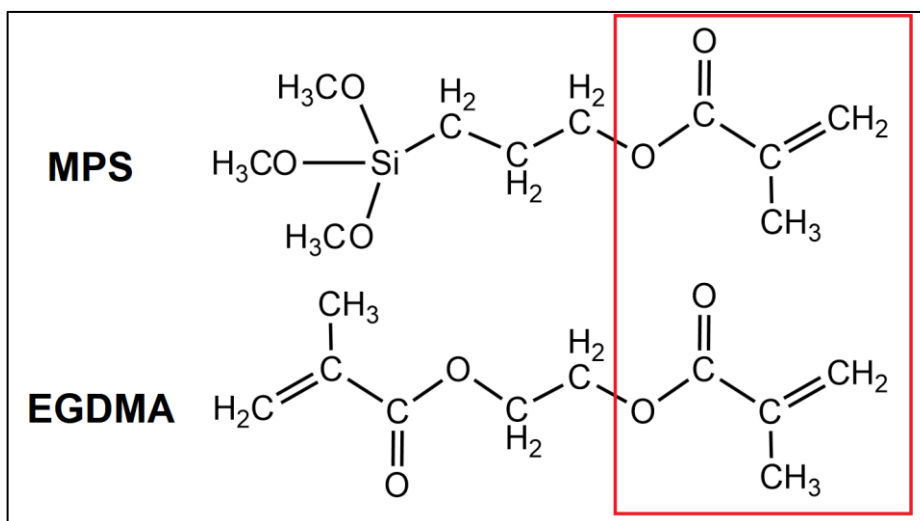


Figura 11 - Comparação entre as estruturas do MPS e do EGDMA. O sítio orgânico-funcional do silanizante é idêntico a uma parte da estrutura do monômero, como está destacado na figura.

Fonte: Autora do trabalho.

Foram preparadas pequenas placas de vidro comum, também feitas de sílica, como mostrado na Figura 12. Cujas preparações tiveram o mesmo procedimento das fibras ópticas. As placas de vidro são destinadas para análise de Microscopia Confocal.



Figura 12 - Fotografia das placas de vidro antes de serem preparadas.
Fonte: Autora do trabalho.

3.4. Síntese dos polímeros

A síntese do MIP foi realizada pelo método *bulk* seguindo trabalhos anteriores do grupo de pesquisa [9], utilizando reagentes anteriormente estudados e adaptada à imobilização sobre a fibra óptica. Ao término da síntese, os polímeros foram lavados para a remoção do analito e dos demais reagentes remanescentes, em seguida, foram feitas análises de religação/adsorção do MIP com o corante AG16 em diferentes condições de temperatura, concentração, tempo e pH, além da seletividade em relação a outros corantes.

Para a obtenção dos polímeros, a reação foi conduzida inicialmente em frascos selados contendo: 0,024 mmol da molécula molde Verde Ácido 16, 0,24 mmol do monômero funcional 1-vinilimidazol e 4,0 mL do solvente porogênico metanol. A mistura foi deixada no banho de ultrassom por 10 minutos e depois sob leve agitação magnética por 2 horas, para que haja interação entre o analito e o monômero funcional. As fórmulas estruturais dos componentes poliméricos são mostradas na Figura 13.

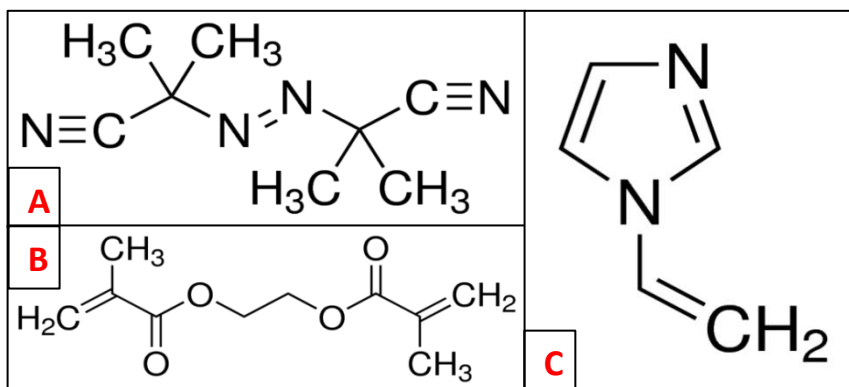


Figura 13 - Fórmulas estruturais do (A) Iniciador Radicalar, (B) Monômero Estrutural e (C) Monômero Funcional.
Fonte: Sigma-Aldrich®

Após esse tempo, a solução foi deixada sob borbulhamento de gás nitrogênio por 10 minutos para remover todo oxigênio dissolvido na solução, para depois adicionar 2,7 mmol do monômero estrutural EGDMA e mantendo mais 10 minutos do fluxo de nitrogênio. Em seguida, foram adicionados 0,061 mmol do iniciador radicalar AIBN e mantido mais 10 minutos em fluxo de nitrogênio (Figura 14A). Finalmente, a fibra foi mergulhada na mistura, de modo que fique suspensa e sem deixar a extremidade tocar no fundo do frasco, e o conjunto foi colocado dentro de uma pequena câmara úmida ambientada com metanol e isenta de ar (Figura 14B). O sistema assim montado foi totalmente selado de modo que não haja saída de nitrogênio e vapor de metanol, assim como manter as condições anaeróbias sem entrada de oxigênio (Figura 15).

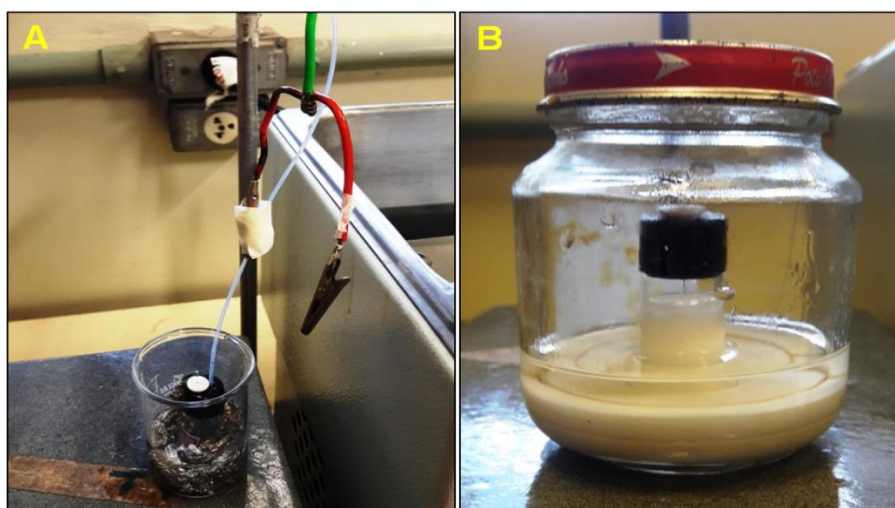


Figura 14 - (A) Processo de adição dos reagentes sob borbulhamento de N_2 antes a incorporação da fibra. (B) Fotografia do frasco contendo a fibra óptica dentro da câmara úmida (sistema completo).
Fonte: Autora do trabalho.

Após o procedimento anterior, a câmara foi inserida num banho-maria a 60° C sob constante controle e monitoramento. O NIP foi sintetizado da mesma maneira, mas com ausência do corante AG16. O tempo médio de síntese dos polímeros foi de 60-90 minutos.

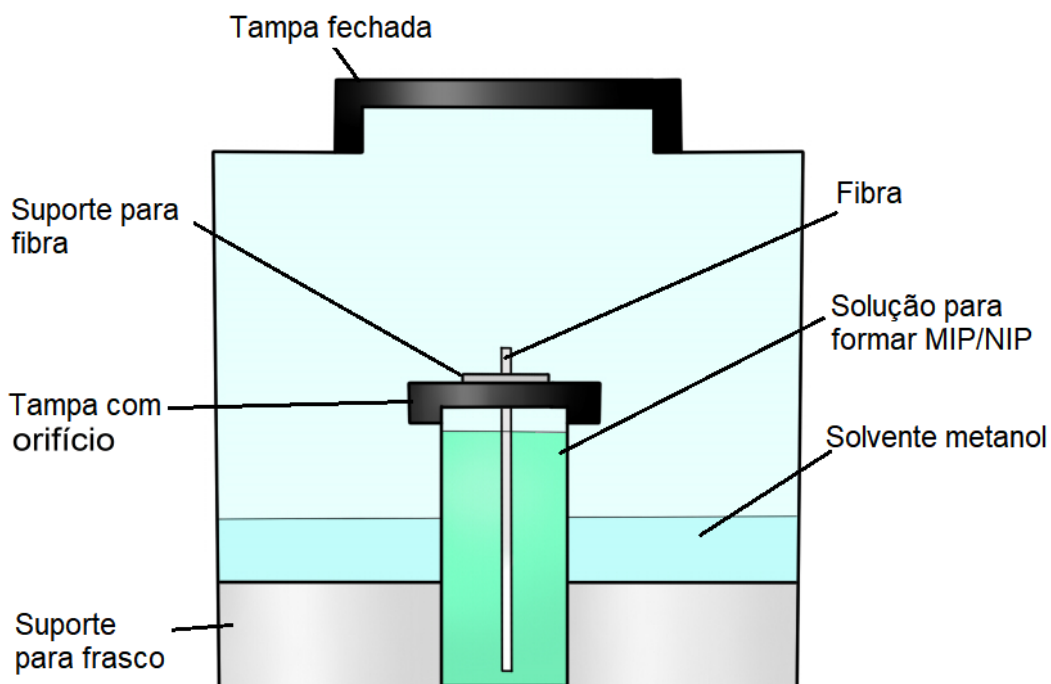


Figura 15 - Ilustração esquematizando a câmara úmida, ela é ambientada com N_2 e vapor de metanol, não há saída de gases e nem entrada de O_2 .
Fonte: Autora do trabalho.

A importância da câmara úmida foi, principalmente, para manter o sistema completamente fechado e sem interferência do gás oxigênio. A temperatura utilizada na síntese (60° C) é muito próxima à temperatura de ebulição do solvente metanol (65° C). Deixando o sistema aberto, o solvente na mistura reacional acabaria evaporando durante o processo de polimerização e, conseqüentemente, comprometendo a formação do MIP. Por isso, o frasco com a mistura dos reagentes foi completamente isolado numa câmara pré-ambientada com nitrogênio e vapor de metanol, para evitar perda do solvente.

3.5. Remoção do template do *tip*-sensor: Etapa de lavagem

As fibras com os polímeros imobilizados foram lavadas com uma mistura de metanol e ácido acético, numa proporção de 7:3 mL (v/v) respectivamente, dentro de

um frasco pequeno sob agitação magnética durante uma hora. Para cada lavagem, o solvente era submetido ao espectrofotômetro para medir a absorbância, a fim de detectar a quantidade de analito removido. Depois disso, outra quantidade do solvente era utilizada para lavagem e posteriormente medida sua absorbância, esse processo foi sendo repetido até não haver mais nenhuma detecção do corante no espectrofotômetro. As placas de vidro também foram lavadas utilizando o mesmo procedimento.

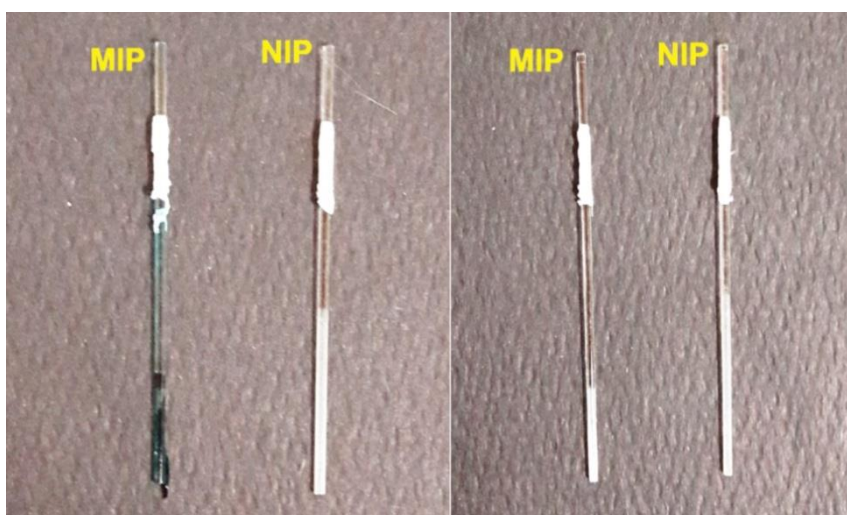


Figura 16 - Fibras ópticas com MIP/NIP antes e depois da lavagem.
Fonte: Autora do trabalho.

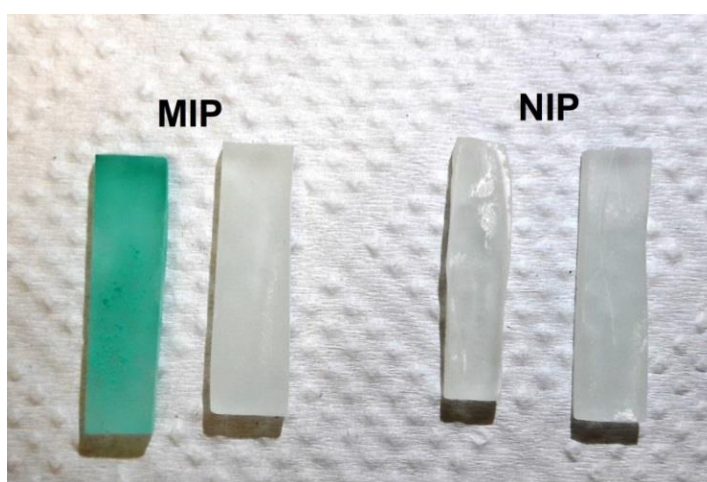


Figura 17 - Placas de vidro com MIP/NIP antes e depois da lavagem.
Fonte: Autora do trabalho.

3.6. Estudos de caracterização

3.6.1. Reflectância em sólidos usando Reflectância Total Atenuada (ATR)

Como possibilidade de desenvolver uma técnica direta para quantificar a adsorção dos polímeros sintetizados pelo método de precipitação, foi usada a reflectância total atenuada (ATR), através do dispositivo batizado de “Barrelino[®]” (Figura 18), o qual é um sistema de vídeo que atua como um detector acoplado ao sistema de fibra óptica e ao espectrofotômetro de UV-Vis da Agilent Technologies Cary 60-UV/Vis, possibilitando análise de reflectância difusa em sólidos.



Figura 18 - Foto do Barrelino[®] usado para medir a reflectância de sólidos.
Fonte: Autora do trabalho.

A reflectância total atenuada é uma técnica de contato bastante usada em análises de superfície de polímeros, com uma eficiência na análise de materiais densos e com alta absorção, como é o caso do polímero impresso MIP.

3.6.2. Microscopia Confocal

A microscopia de varredura confocal é uma técnica não invasiva e não destrutiva de análise da superfície de uma amostra. Possui o potencial de monitoramento *in situ* para caracterizar estruturas superficiais finas com alta precisão, além de monitorar alterações superficiais com alta resolução. Sendo um

sistema de varredura sem contato e, portanto, segura quando usada em objetos valiosos ou sensíveis, fornecendo uma identificação única do material, semelhante a uma impressão digital, contendo informações de rugosidade e espessura em numa escala micrométrica.



Figura 19 - Imagem ilustrativa do microscópio óptico confocal (Olympus).

Fonte: <http://www.directindustry.com/pt/prod/olympus/product-17434-866189.html> [53].

Inicialmente foi selecionado uma lente objetiva de aumento de 5 vezes, e para as análises foi empregado um aumento em resolução de 100 vezes. O sistema de análise compreende o microscópio confocal conectado a um computador com um software específico (Olympus®), do qual foi possível obter imagens tridimensionais de alta definição. As imagens foram coletadas de 10 diferentes pontos de cada amostra, e a partir disso foram calculados os parâmetros de rugosidade e espessura média destes materiais.

3.7. Estudos de otimização

3.7.1. Protocolo de medidas

Foram realizados estudos de otimização de três parâmetros para utilizar o *tip*-sensor, sendo eles: temperatura, tempo de interação e pH da solução em análise. Utilizando a espectrofotometria da reflectância no UV-Vis, ressalta-se ainda que, como cada material possui capacidades únicas de absorver luz em um ou mais

comprimentos de ondas específicos, no caso do Verde Ácido 16, ele possui uma máxima absorbância em 640 nm, o que significa que, no caso do monitoramento da reflectância, o incremento da concentração do corante promoverá uma diminuição do sinal nessa região de comprimento de onda. Em outras palavras, a reflectância é inversamente proporcional à concentração do corante.

Finalmente, com a finalidade de estabelecer um protocolo de medida usando o sensor proposto, a seguir, é descrito o procedimento realizado nos estudos de otimização e seletividade, além das análises das amostras reais coletadas:

- i. Primeiramente, o MIP-optodo foi inserido em uma solução contendo o analito (seus interferentes ou na amostra real) durante um tempo pré-estabelecido e sob agitação leve e constante antes da realização das medidas, tal como está ilustrado na Figura 20.
- ii. Passado o tempo de interação do corante com o MIP (ou NIP) no *tip*-sensor, ele foi retirado da solução, removendo o excesso que fica retido na fibra. Neste ponto, se adequadamente adsorvido, o *tip*-sensor apresenta a coloração do corante analisado.
- iii. A seguir, o MIP-optodo (ou NIP-optodo) é inserido num frasco contendo água (também usado como branco da análise) para finalmente realizar a medida para cada solução, as quais foram sempre realizadas em triplicata.

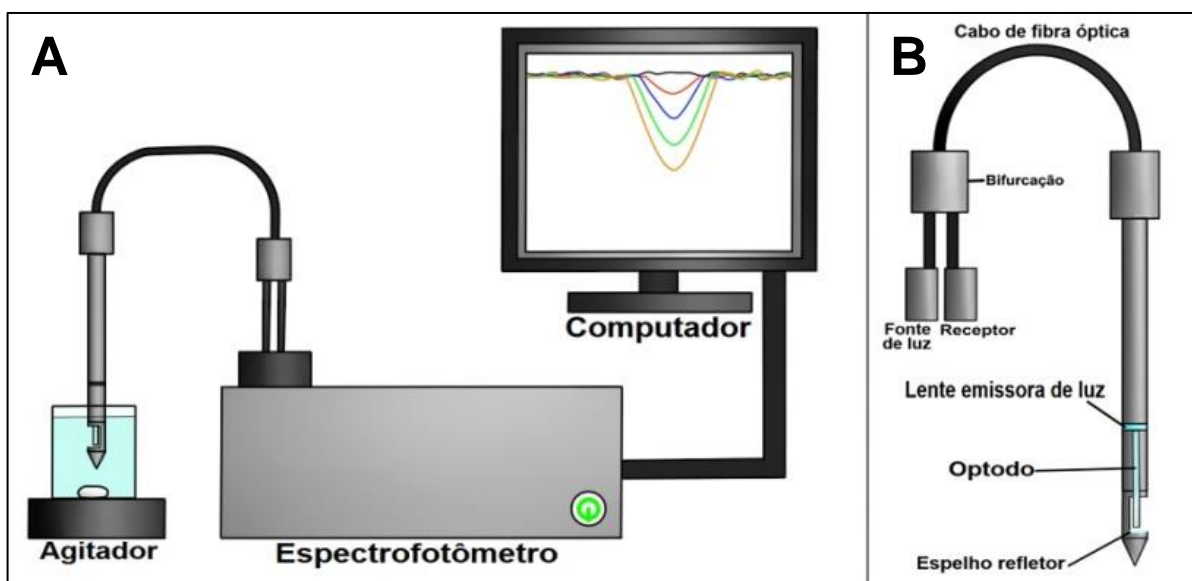


Figura 20 - Ilustração do equipamento utilizado (A). Uma visão mais detalhada da peça onde o optodo é aplicado para realizar as medidas de reflectância (B).

Fonte: Autora do trabalho.

Uma solução estoque de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AG16 foi preparada em água. A partir deste estoque, seis soluções de 10 mL foram preparadas com as concentrações: $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; cada solução foi colocada em um pequeno frasco onde a fibra será imersa.

3.7.2. Estudos de otimização para tempo de interação, temperatura e pH da solução

Na etapa de otimização do sensor óptico, foram avaliados os efeitos dos três parâmetros diferentes, com a finalidade de encontrar as melhores condições analíticas para aplicar a religação do MIP-optodo com o corante analito: temperatura, tempo de interação e pH da solução.

Para verificar qual é a influência do tempo de interação entre o analito e o MIP-optodo, foram realizados experimentos entre 10 e 60 minutos de interação. Utilizou-se um frasco de 10 mL com concentração de $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, nos diferentes tempos: 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min. Com a metodologia previamente explicada, utilizou-se um comprimento de onda fixo a 640 nm.

Todas as medidas anteriormente apresentadas foram realizadas em temperatura ambiente de $25 (\pm 3) ^\circ\text{C}$. Por isso, foram feitos estudos sobre o efeito da temperatura na interação/relição entre o MIP-optodo e o corante, utilizando temperaturas mais quentes do que a do ambiente. Uma solução do corante com a mesma concentração de $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ foi utilizada para fazer as interações e foi aquecida utilizando um agitador magnético com função tanto de modificar a temperatura quanto de aquecimento, as medidas foram feitas nas seguintes temperaturas: 25, 30, 40, 50 e 60°C .

Para finalizar a otimização, estudos de religação foram feitos em soluções com diferentes valores de pH. Cabe ressaltar que até aqui o pH da solução de análise foi de aproximadamente 7. Desta vez, utilizaram-se outros valores de pHs: 3, 5, 9 e 11, além do pH 7 para poder comparar. O pH das soluções foi controlado usando soluções de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, além de solução de

tampão fosfato de 2,0 mmol L⁻¹. As medidas foram feitas utilizando as concentrações explicadas no protocolo de medidas descrito anteriormente.

3.7.3. Perfil de resposta do sensor em diferentes concentrações de corante

Ao otimizar cada parâmetro corretamente, foi obtida uma curva analítica da reflectância em função da concentração em 640 nm, para avaliar o perfil de resposta do sensor e estimar o limite de detecção e quantificação. Foram aplicadas 6 soluções de 10,0 mL de AG16 com as mesmas concentrações utilizadas anteriormente, usando água como solvente e as medições foram realizadas seguindo o protocolo previamente explicado.

3.8. Avaliação da seletividade

Tendo sido o MIP-optodo otimizado em relação à construção e análise, a seguinte etapa de estudo foi a análise da seletividade do sensor proposto. Para realizar esses estudos, foram selecionados quatro outros corantes diferentes: Vermelho Ácido 1 (AR1), Violeta Direto 51 (DV51), Vermelho Ácido 114 (AR114) e Amarelo Direto 50 (DY50); cujas fórmulas estruturais são apresentadas na Figura 21 junto com a fórmula estrutural do analito. Esses corantes foram escolhidos por apresentar uma estrutura de fórmula semelhante (AR1), assim como estruturas mais diferenciadas. Para cada um dos interferentes, foram preparadas soluções com as mesmas concentrações utilizadas anteriormente, com água como solvente. Cada corante foi analisado com seu comprimento de onda específico obtido no espectro de reflectância.

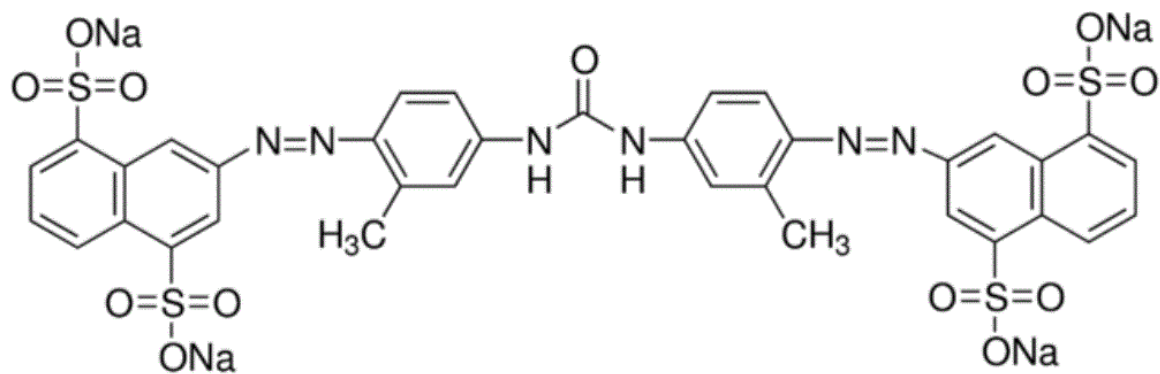
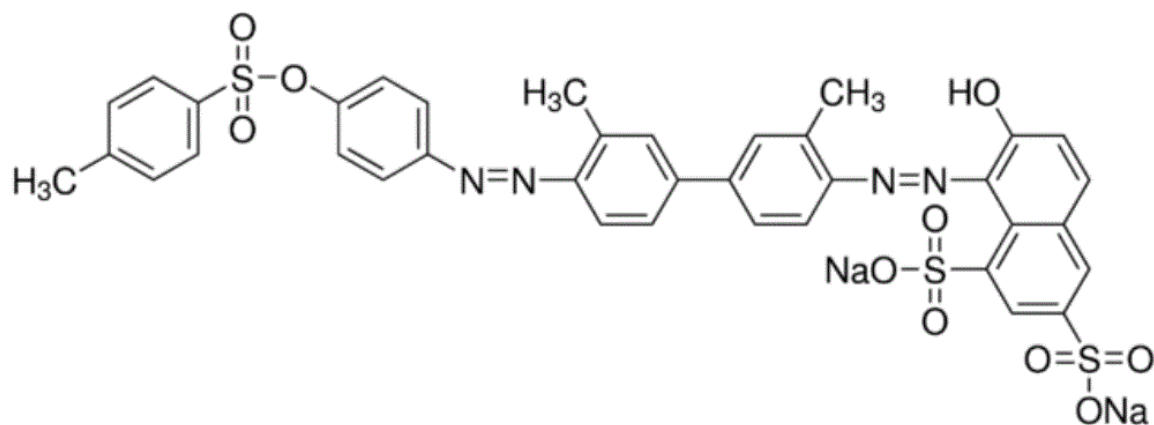
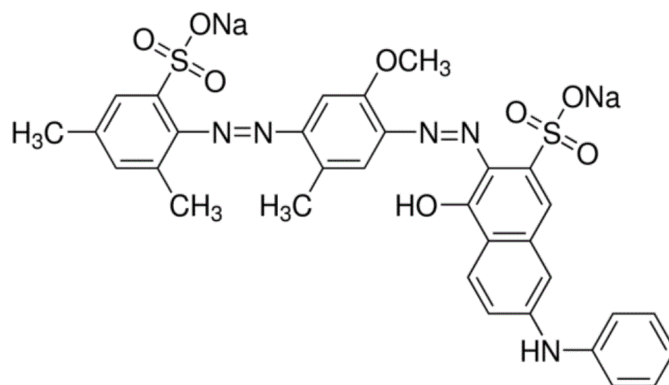
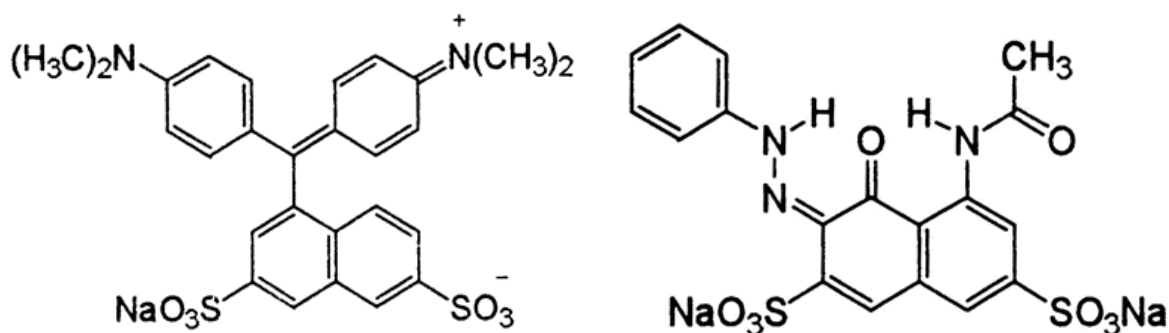


Figura 21 – Fórmulas estruturais dos corantes empregados como interferentes com seus respectivos comprimentos de onda.
Fonte: Sigma-Aldrich®

3.9. Aplicação do MIP-optodo em amostras de efluentes e de resíduos industriais

Após a realização de todos os experimentos de otimização, caracterização e seletividade, a eficiência do MIP-optodo foi estudada utilizando amostras reais de efluentes e resíduos industriais. Algumas amostras foram coletadas do Rio Jacaré-Guaçu da cidade de Araraquara, Brasil. assim como um resíduo industrial no tratamento inicial de uma empresa têxtil, sendo que essa empresa informou que não há presença do corante analito.

Essas amostras foram preparadas adicionando em um frasco de 10 mL e contaminadas com o corante AG16, de modo que foram obtidas três concentrações conhecidas: $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,4 \text{ mmol L}^{-2}$ e $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ do analito. No caso da amostra do resíduo industrial, ela foi dividida em duas partes: uma diluída em 50 vezes e a outra sem nenhuma diluição, somando num total de 3 amostras diferentes.

Depois de serem preparadas, essas amostras foram submetidas à interação com o MIP-optodo nas devidas condições otimizadas, seguindo o mesmo protocolo de medida para obter os valores da reflectância, utilizando o espectrofotômetro UV-Vis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que serão apresentados posteriormente se dividem em quatro etapas. A primeira mostra os estudos de caracterização da morfologia do MIP-optodo usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF), Reflectância Total Atenuada (RTA) e Microscopia Confocal. A segunda mostrará os estudos de otimização das condições de análise do sensor em relação à religação do corante no MIP-sensor (na fibra óptica modificada), para o qual foram avaliados os parâmetros de tempo de interação o entre analito e o MIP-sensor (incubação), temperatura e pH da solução da análise.

A terceira etapa mostra os parâmetros de resposta do MIP-sensor, tais como a faixa de trabalho e outras figuras de mérito, assim como também sua seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade, sob as condições otimizadas. Finalmente, a quarta e última etapa mostrará a aplicação do MIP-optodo em amostras de efluentes e resíduos industriais.

4.1. Características espectrais do corante AG16

Para determinar o comprimento de onda onde ocorre a máxima absorção do corante Verde Ácido 16, foram realizadas medidas utilizando espectrofotometria UV-Vis, numa faixa de comprimentos de onda entre 400 e 800 nm. O perfil dos espectros de absorção do corante é mostrado na Figura 22, indicando que o comprimento de onda com maior valor de absorbância foi em 640 nm.

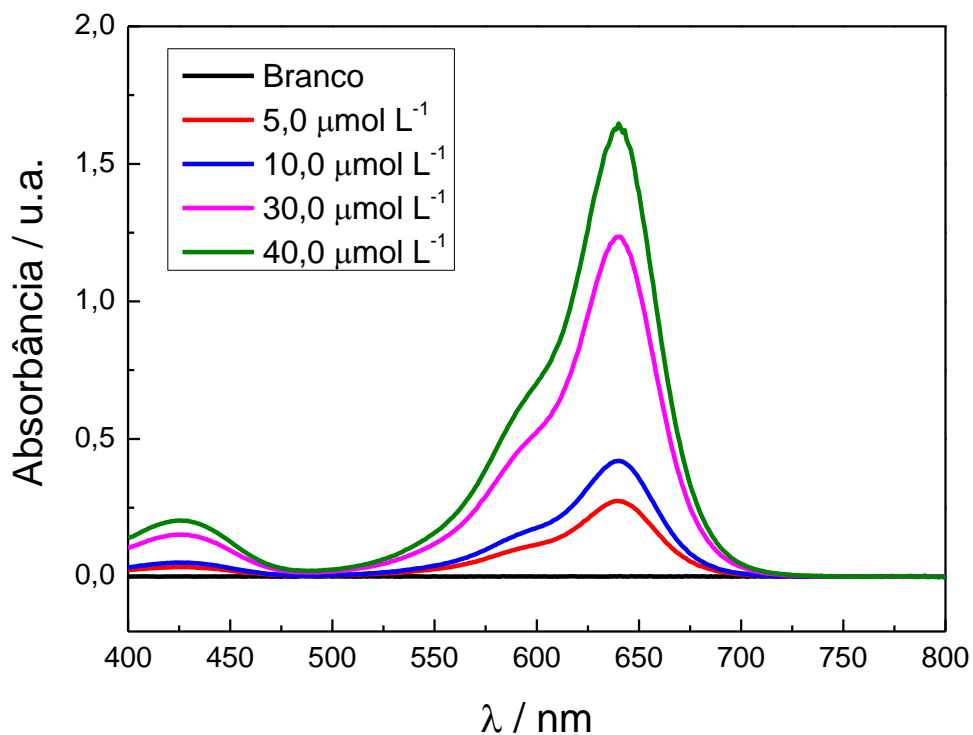


Figura 22 - Espectro de absorção para o corante Verde Ácido 16, em água no UV-Vis.
Fonte: Autora do trabalho.

4.2. Caracterização morfológica dos polímeros e sensores

4.2.1. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para observar a estrutura de formação e uniformidade dos polímeros, foram registradas imagens visando microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo. As imagens MEV mostradas a seguir na Figura 23 apresentam a morfologia dos polímeros obtidos por *bulk* sem estarem depositados na fibra óptica, como referência para a Figura 24.

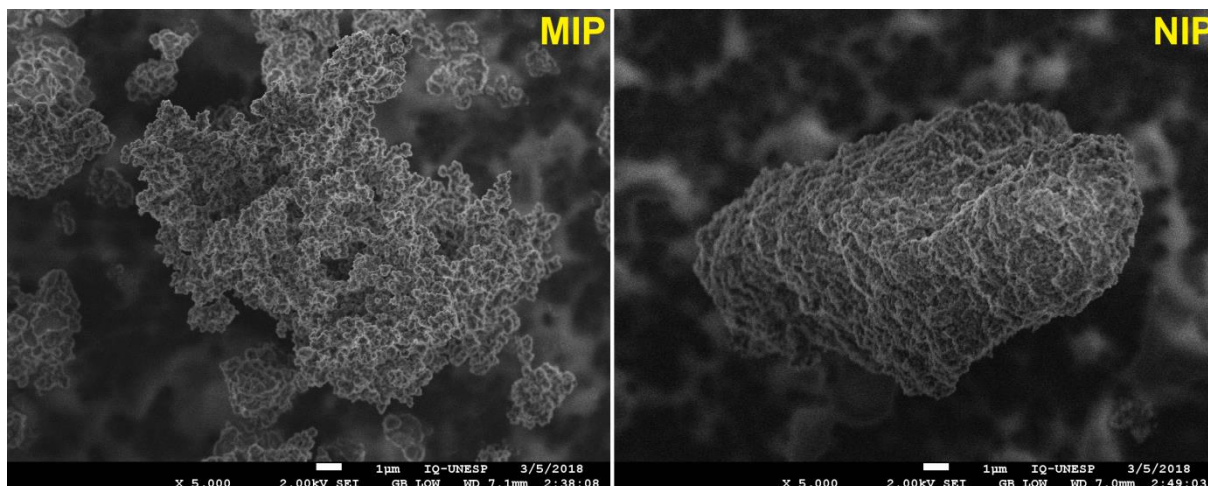


Figura 23 - Imagens MEV dos polímeros MIP e NIP para o corante AG16.
Fonte: Autora do Trabalho.

Em seguida, foram obtidas as imagens das fibras ópticas sem os polímeros imobilizados, uma imagem mostra a fibra limpa (A) e a outra a fibra silanizada (B), ambas mostradas na Figura 24.

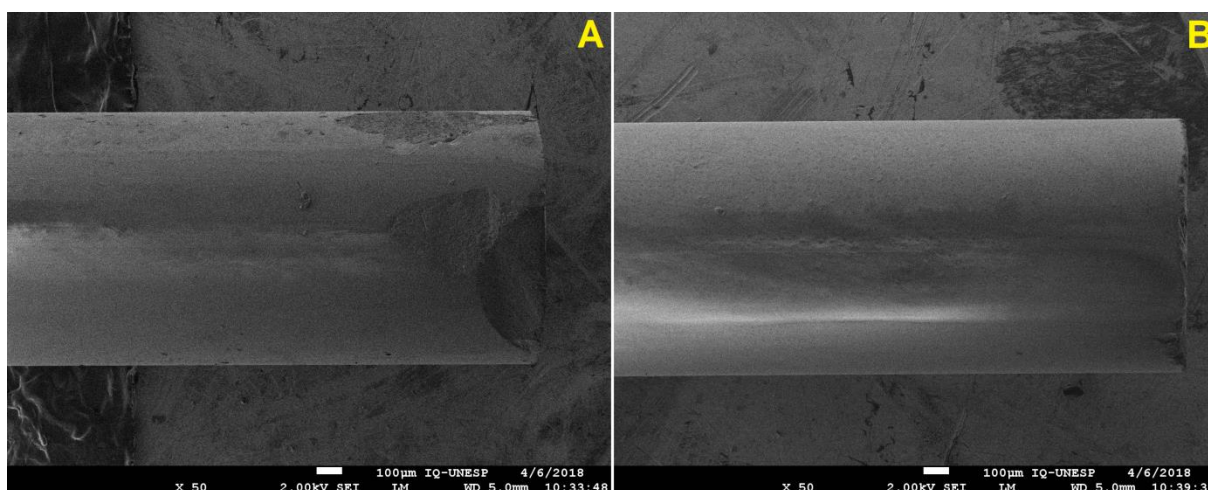


Figura 24 - Imagens MEV das fibras ópticas sem os polímeros: Limpa (A) e silanizada (B).
Fonte: Autora do Trabalho.

Finalmente, foram obtidas as imagens MEV dos polímeros imobilizados nas fibras ópticas (Figuras 25 e 26), em duas diferentes ampliações (50x e 5000x). Ao comparar as fibras na Figura 25 com as fibras sem polímero na Figura 24, é possível visualizar uma grande diferença, pois mostrou a presença que partículas aderidas nas fibras ópticas, comprovando que houve uma eficiente polimerização e imobilização. Essa eficiência também é mostrada na Figura 25, a qual revela que as características morfológicas dos dois polímeros foram conservadas, o que refletiu

nas excelentes propriedades de seletividade, que já tinham sido mostradas anteriormente em trabalhos do grupo de pesquisa [9].

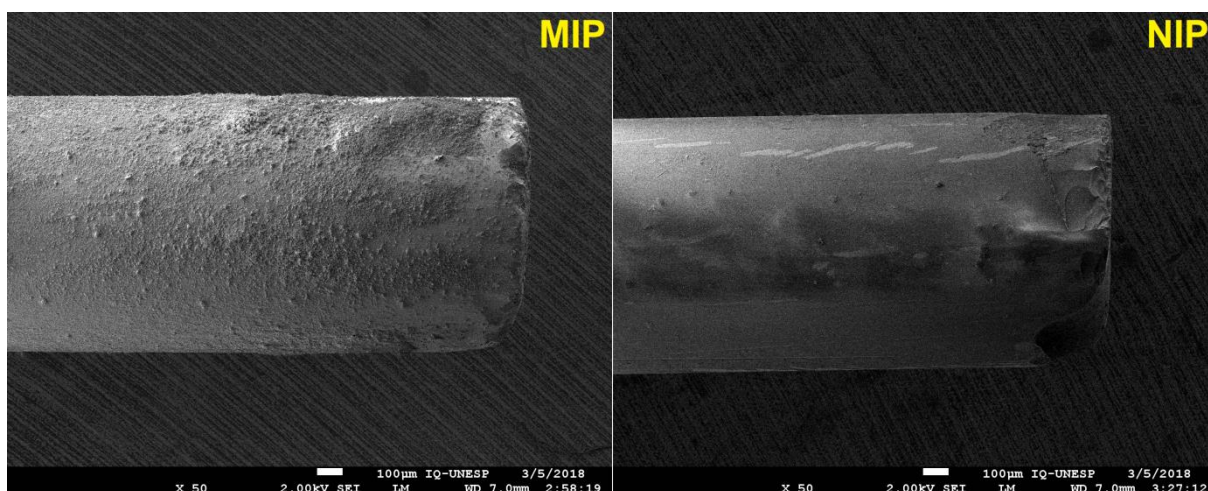


Figura 25 - Imagens MEV dos polímeros MIP e NIP na fibra, ampliado em 50x, para o corante AG16.
Fonte: Autora do trabalho.

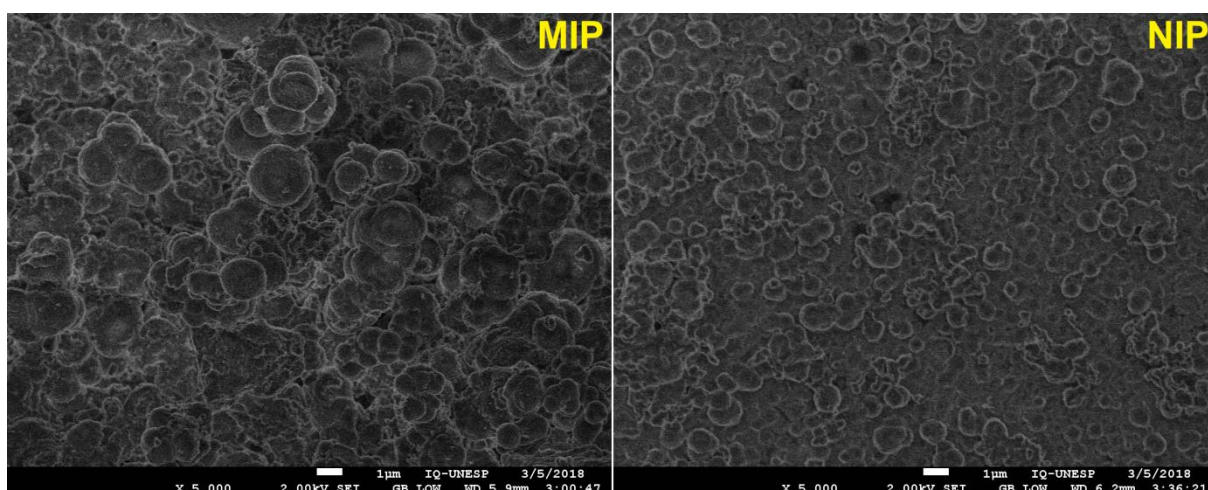


Figura 26 - Imagens MEV dos polímeros MIP e NIP na fibra, ampliado em 5000x, para o corante AG16.
Fonte: Autora do Trabalho.

Adicionalmente, esta conservação na morfologia dos polímeros sobre um suporte sólido é esperado, conforme processos de síntese reportados na literatura seguindo protocolos de síntese de MIP em suportes modificados com o MPS, tais como sílica ou nanopartículas magnéticas [54, 55, 56].

4.2.2. Caracterização por Infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem a finalidade de caracterizar as estruturas dos materiais, como as estruturas dos polímeros impressos, das fibras, do analito e dos reagentes empregados na síntese. No caso dos polímeros impressos, foi feita a análise tanto para os polímeros sem estarem imobilizados na fibra, quanto para os que estão aderidos na fibra. Primeiramente, o espectro dos polímeros MIP e NIP (sem a fibra) e do monômero estrutural EDGMA é mostrado na Figura 27.

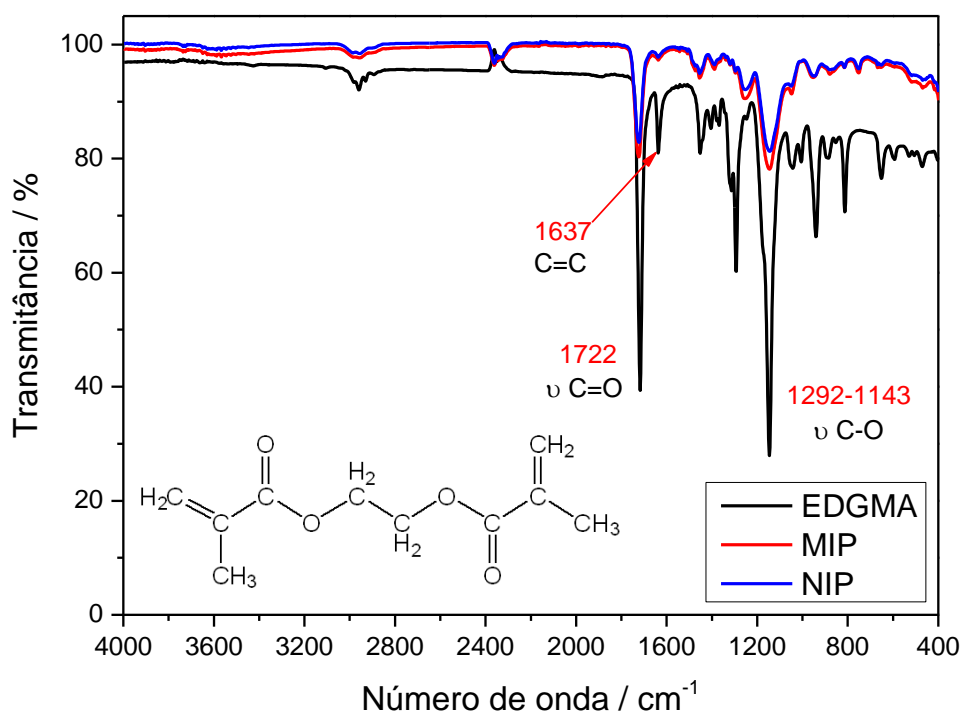


Figura 27 - Espectro no Infravermelho do MIP e NIP (sem a fibra) e com o monômero estrutural EDGMA, junto com sua estrutura molecular.

Fonte: Autora do trabalho.

Ao analisar as bandas dos dois polímeros impressos, é possível observar duas bandas em destaque: em 1722 cm^{-1} , essa banda é referente ao grupo éster, mas especificamente ao estiramento C=O; enquanto as bandas entre $1292\text{-}1143\text{ cm}^{-1}$ são referentes ao estiramento C-O, também pertencente ao grupo éster [57]. Essas duas bandas se apresentam em intensidade maior no espectro do EDGMA, isso porque os polímeros impressos são compostos principalmente desse monômero estrutural, cuja estrutura possui o grupo funcional éster, como é mostrado na Figura

26. Isso explica as pequenas bandas no espectro do MIP e do NIP, o fato de serem bandas menores evidencia a polimerização.

Outra evidência de que houve polimerização foi a grande diminuição da intensidade do sinal em 1637 cm^{-1} , essa banda se refere à dupla ligação C=C [57]. Enquanto ela se destaca no espectro do EDGMA, no espectro dos polímeros ela diminui drasticamente, isso porque essa ligação dupla é quebrada pelo iniciador radicalar para dar início à polimerização. Não há indícios do monômero funcional 1-vinilimidazol, provavelmente devido à baixa quantidade em relação aos limites de detecção do equipamento.

Na Figura 28 a seguir, é mostrado o espectro no infravermelho do corante analito. A banda em 1151 cm^{-1} se refere às características do grupo sulfonado, as bandas em 703 cm^{-1} são estiramentos C-H e as bandas em 1336 cm^{-1} são estiramentos C-N, ambas dos anéis aromáticos. Enquanto as bandas em 1573 cm^{-1} são correspondentes aos estiramentos das ligações duplas de carbono C=C, também dos anéis aromáticos [57].

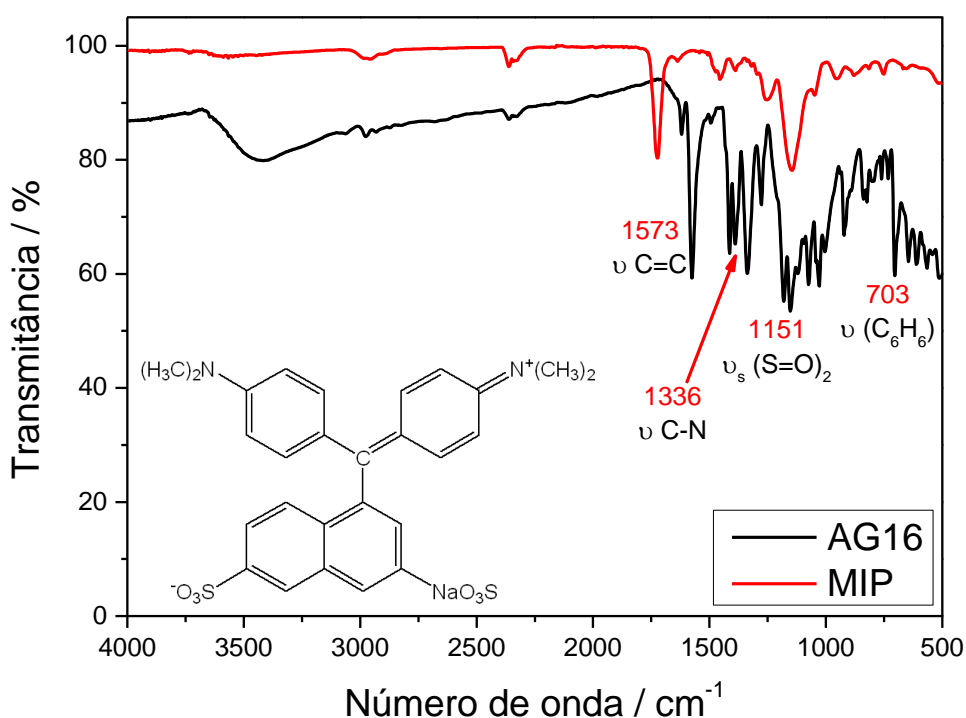


Figura 28 - Espectro no Infravermelho do MIP e do corante AG16.

Fonte: Autora do trabalho.

Os resultados nas Figuras 29 e 30 mostradas a seguir, são medidas do infravermelho das fibras ópticas. Uma observação importante é que a detecção do

IV nas fibras é muito mais baixa do que seria nos polímeros em pó, uma vez que a capacidade do equipamento é limitada devido à pequena quantidade de polímero imobilizado e à dificuldade em realizar a medida diretamente na fibra óptica. Por isso, os espectros das fibras ópticas modificadas com MIP, ou NIP, foram plotados em uma escala de 80 a 100% (Figura 29) e de 95 a 100% (Figura 30) de transmitância, para que se possa obter uma melhor visualização das bandas. Na Figura 29, é mostrado o espectro das fibras limpa e silanizada.

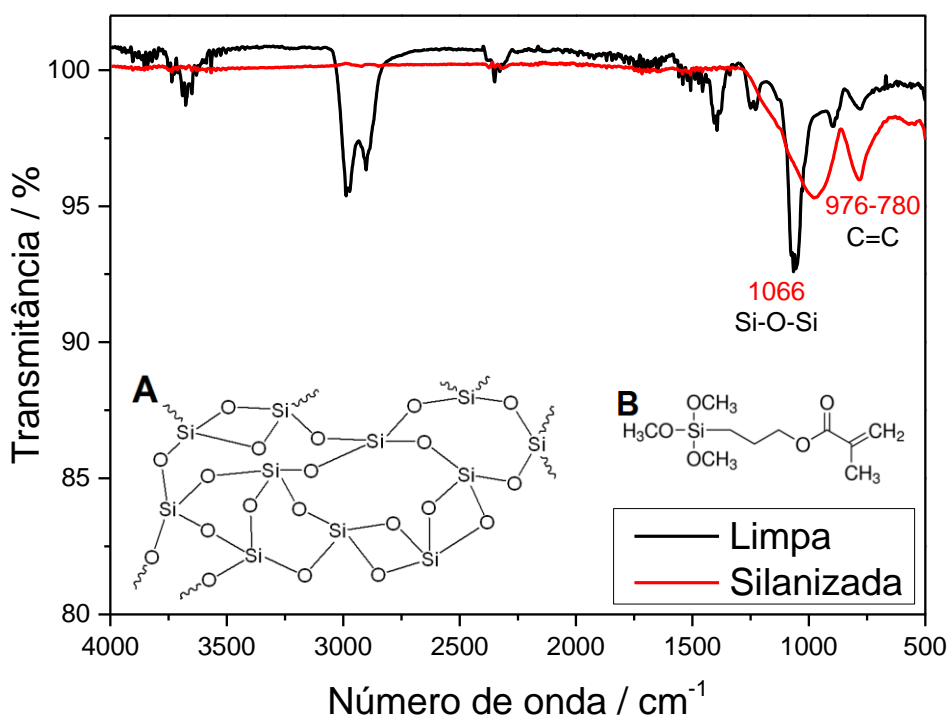


Figura 29 - Espectro das fibras limpa e silanizada, junto com as estruturas da sílica (A) e do MPS (B).
Fonte: Autora do trabalho.

No espectro referente à fibra limpa, notou-se uma banda em destaque em 1066 cm^{-1} , que se refere ao estiramento da combinação Si-O-Si da sílica, que é a composição da fibra de vidro [58]. No espectro do MPS, destacou-se uma banda entre $976\text{-}780\text{ cm}^{-1}$, onde indica as ligações duplas C=C do sítio orgânico-funcional da molécula. Vale lembrar que o lado sílico-funcional reagiu com a superfície da fibra, enquanto o lado orgânico é onde o monômero estrutural EDGMA irá dar início à cadeia polimérica do MIP, essas informações no espectro comprovam que ocorreu silanização nas fibras.

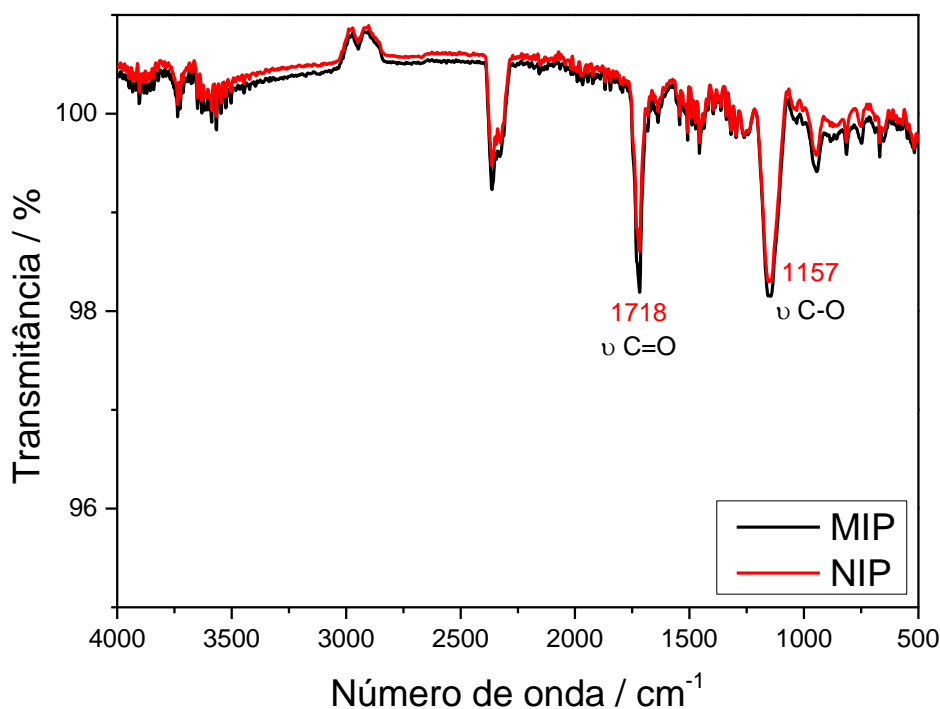


Figura 30 - Espectro no infravermelho das fibras com MIP e NIP.
Fonte: Autora do trabalho.

No espectro da Figura 30 acima, observa-se o mesmo perfil de bandas para ambos os polímeros. As bandas em destaque estão em 1157 cm^{-1} (estiramento C-O) e 1718 cm^{-1} (estiramento C=O), ambos do grupo funcional do éster e também são as mesmas bandas detectadas no infravermelho dos polímeros sem a fibra na Figura 27. Cabe ressaltar, novamente que o motivo das bandas serem muito pequenas foi a dificuldade em detectar a fina camada de polímero na superfície da fibra óptica [57].

Dos experimentos por FTIR, pode ser verificada a modificação das fibras com MPS e a posterior polimerização do MIP e do NIP. Além de comprovar que os polímeros mantiveram suas características, mesmo depois imobilizados nas fibras ópticas.

4.2.3. Reflectância em sólidos utilizando ATR nos experimentos de adsorção do AG16 ao MIP em pó obtido por *bulk*

Os resultados que serão mostrados a seguir foram obtidos através das interações dos polímeros sólidos MIP e NIP, sintetizados por bulk, para com o

corante Verde Ácido 16. Na preparação das amostras, uma quantidade de 8 mg de polímero foi deixada para interagir com 1,00 mL de uma solução do corante, dentro de tubos de eppendorf[®], nas seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 31). Sendo homogeneizados durante duas horas, para depois centrifugar e remover o sobrenadante, os sólidos remanescentes foram deixados para secagem numa estufa.



Figura 31 - Fotografia dos tubos de eppendorfs[®] que contêm os polímeros interagindo com o corante.
Fonte: Autora do trabalho.

Após a secagem, os sólidos com o corante religado foram submetidos a reflectância total atenuada (RTA), sendo realizadas várias medidas. Os espectros de reflectância difusa obtidos são mostrados na Figura 32 e o gráfico das curvas da variação da reflectância em função da concentração é mostrado na Figura 33.

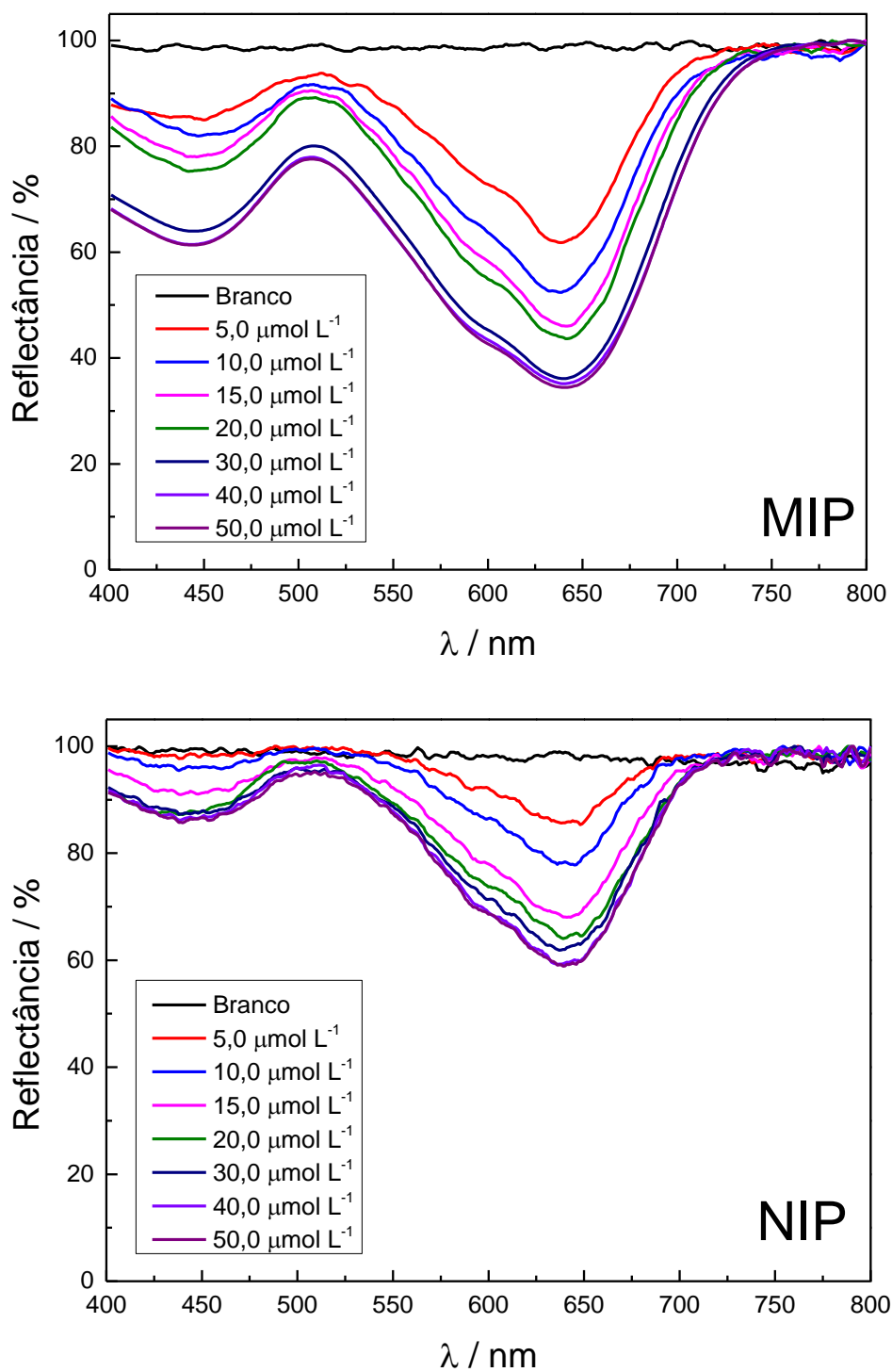


Figura 32 - Espectros de reflectância na região UV-Vis dos polímeros soltos utilizando o Barrelino®.
Fonte: Autora do trabalho.

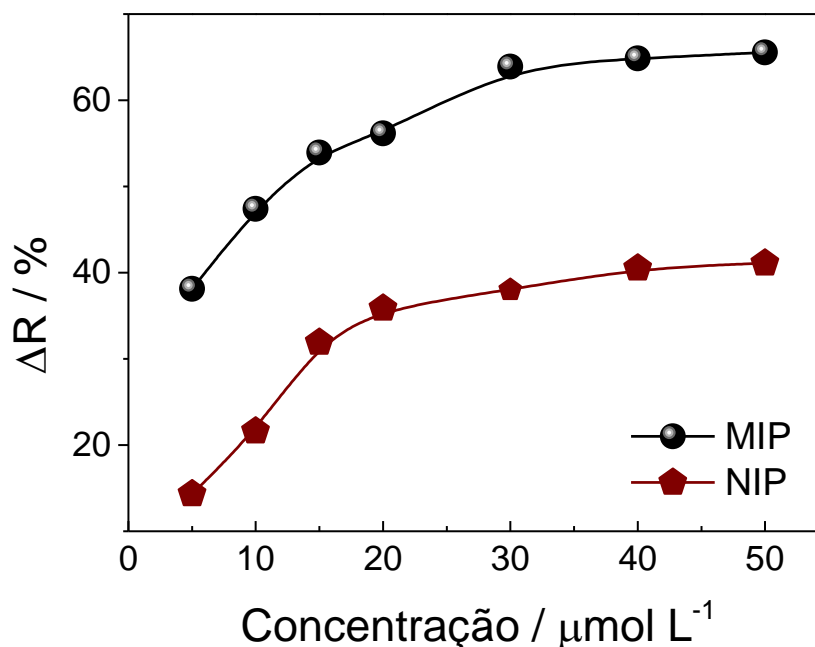


Figura 33 – Comparação da variação da reflectância das curvas do MIP e NIP obtidas por RTA e derivadas da Figura 32.
Fonte: Autora do trabalho.

Os resultados mostrados nas figuras anteriores indicaram que o MIP apresentou uma ótima adsorção do corante, especialmente porque houve uma boa alteração da reflectância nas primeiras concentrações do corante, mostrando uma forte relação com o AG16 em baixas concentrações. A reflectância começou a ficar estável aproximadamente aos $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de concentração para ambos os polímeros. Ainda poderão ser realizados estudos mais aprofundados com a finalidade de explorar mais a técnica que ainda é inédita na literatura, e que tem potencial para quantificar a adsorção diretamente na matriz polimérica, assim como para caracterizar o polímero impresso através de imagens fotográficas.

O equipamento usado permite obter fotografias ou ainda gravar vídeos dos experimentos realizados. Assim, foram fotografados os sólidos para mostrar suas aparências conforme foram sendo realizados os experimentos e são mostrados nas Figuras 34 e 35, nessas fotografias percebe-se que há uma mudança da coloração dos sólidos conforme aumenta a concentração de AG16, e que no MIP esta adsorção é maior que para o NIP, embora esta diferença pareça sutil nas fotografias registradas, porém clara na Figura 32, ela pôde ser observada. Entretanto, ainda estudos adicionais deverão ser feitos para refinamento dos dados, afim de melhorar a técnica e obtenção das imagens e espectros, por exemplo, analisando o polímero úmido, diminuindo as concentrações dos corantes, estudando a quantidade de

polímero a ser colocado no dispositivo de medidas, entre outros parâmetros, de forma que se possa obter resultados realmente conclusivos, e que possibilitem quantificação ou caracterização dos MIP e NIP pelas imagens de ATR.

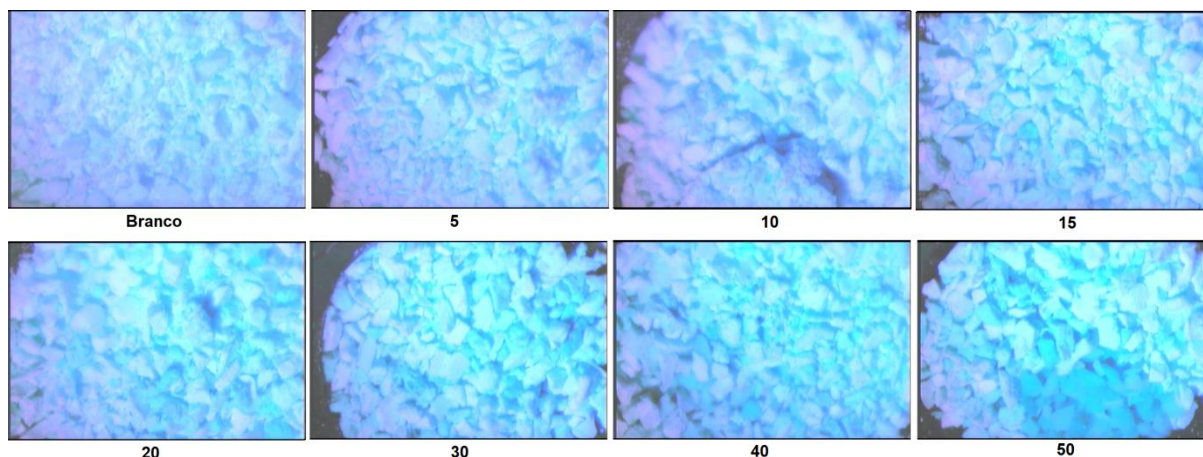


Figura 34 - Imagens do MIP extraídas de experimentos realizados no Barrelinho® com variação na concentração de 5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.
Fonte: Autora do trabalho.

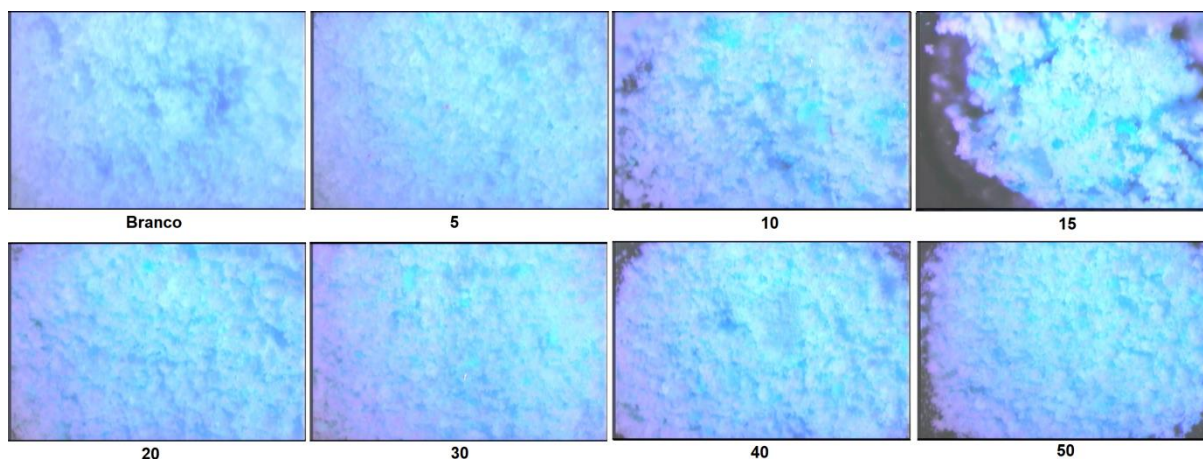


Figura 35 - Imagens do NIP extraídas de experimentos realizados no Barrelinho® com variação na concentração de 5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.
Fonte: Autora do trabalho.

4.2.4. Análise em Microscopia Confocal

O microscópio óptico confocal foi usado para adquirir imagens topográficas dos polímeros (MIP e NIP) em formato tridimensional (3D), e também para obter informações morfológicas de rugosidade e espessura. As imagens em formato 3D do MIP (i) e NIP (ii) são mostradas na Figura 36. Analisando a rugosidade superficial

e a espessura dos polímeros (MIP (i) e NIP (ii)), é possível observar que houve aumento significativo da rugosidade e espessura de MIP para NIP devido às cavidades seletivas complementares ao analito que foram formadas durante o processo de síntese. Os valores de rugosidade (R_a) de MIP e NIP foram $0,57 (\pm 0,07)$ e $0,31 (\pm 0,04)$ μm , respectivamente. As espessuras dos polímeros foram estimadas a partir da média de 10 medidas, e os valores obtidos foram $10,8 \pm 0,9$ para MIP e $6,2$ para NIP $\pm 0,6$ μm .

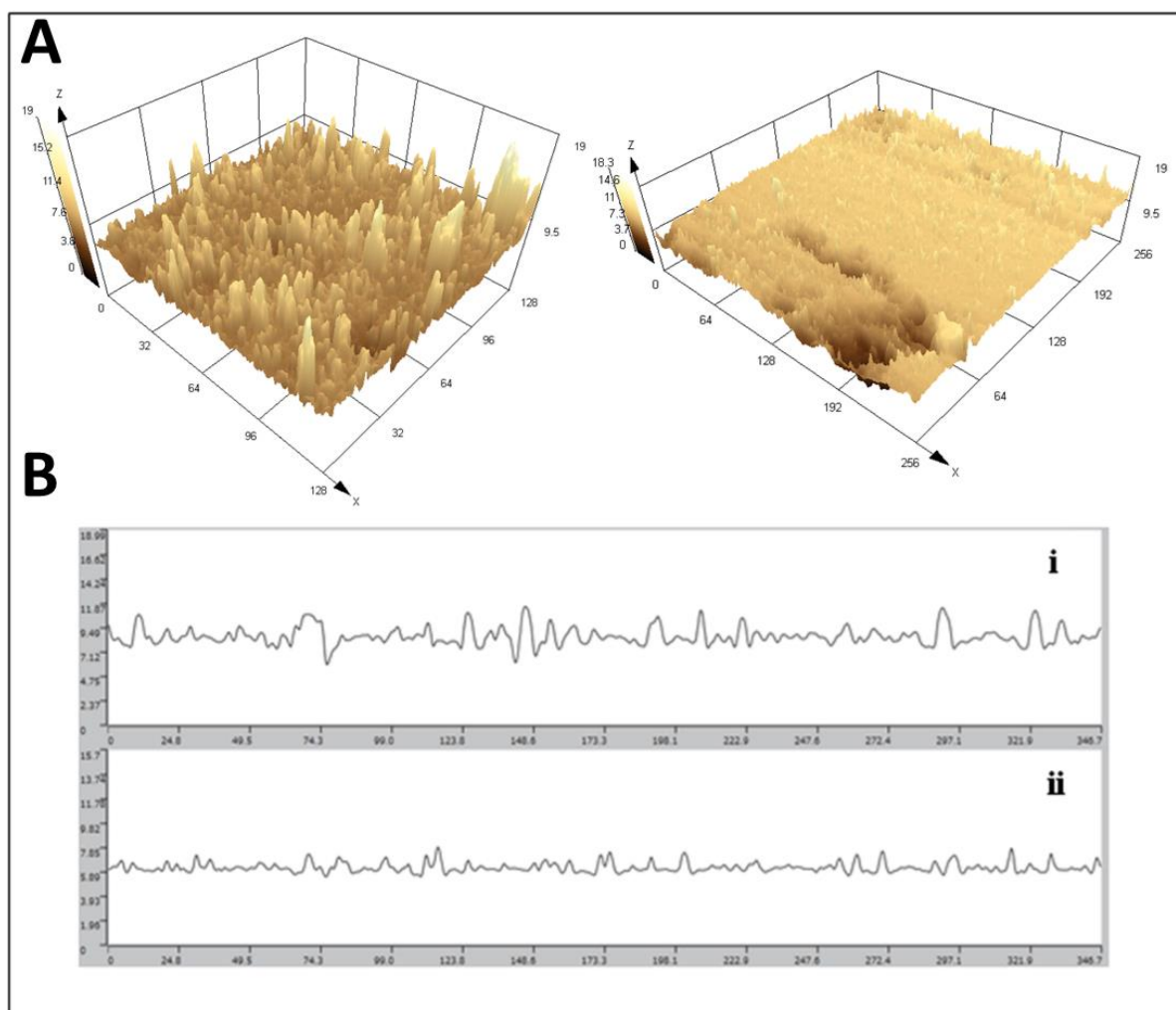


Figura 36 - Imagem tridimensional obtida com o microscópio óptico confocal com aumento de 100 vezes da superfície dos polímeros (MIP e NIP) (A) e uma imagem representativa da análise da rugosidade superficial de MIP(A) e NIP (B).

Fonte: Autora do Trabalho.

4.3. Estudos de otimização

4.3.1. Otimização do tempo de interação entre o analito e o MIP–sensor

Para verificar qual é a influência do tempo de interação entre o analito e o MIP-optodo, foram realizados experimentos entre 10 e 60 min de interação, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 37. Pode-se observar um aumento na variação da reflectância (ou uma diminuição no valor absoluto da reflectância) conforme aumenta o tempo de interação, indicando que há uma maior quantidade de analito religando-se ao MIP conforme mais tempo é deixado interagindo entre a solução e a superfície com o sensor. É evidente também que há uma maior eficiência do MIP em relação ao NIP, tal como mostrado nas curvas da reflectância em função do tempo em minutos, mostradas na Figura 38.

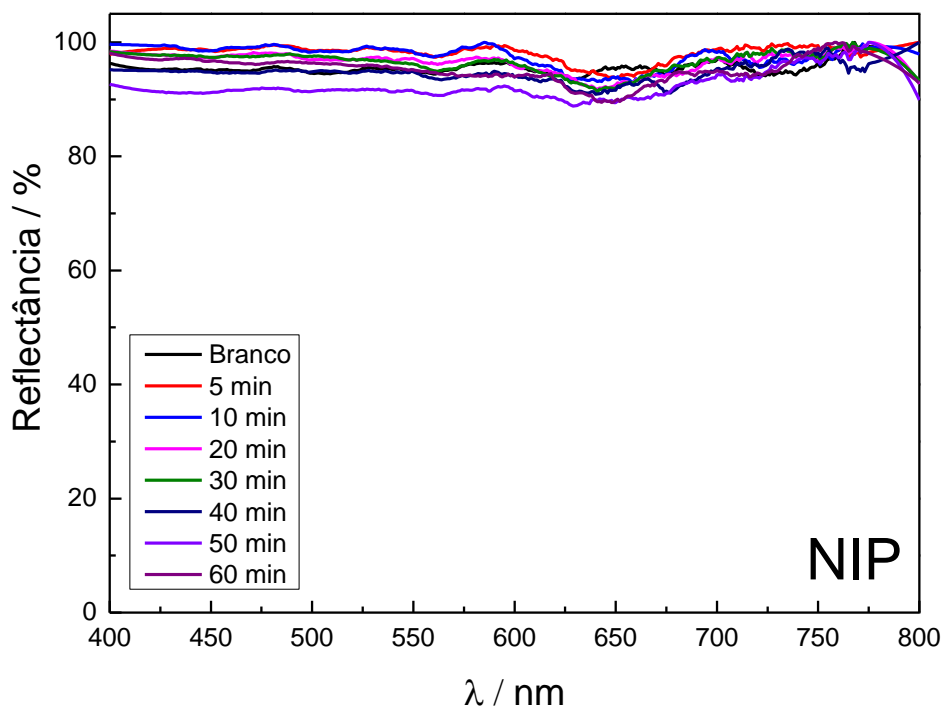
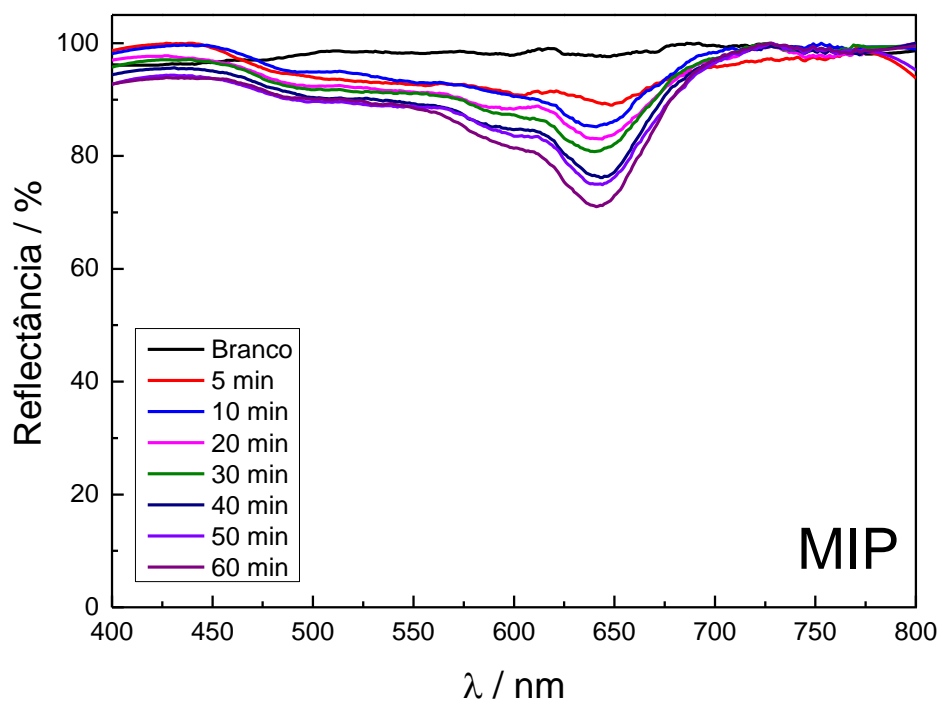


Figura 37 - Espectros de reflectância na região UV-Vis para diferentes tempos do corante AG16 dissolvido em água empregando a fibra óptica modificada com MIP e NIP, para monitoramento. As análises foram realizadas em 10,0 mL de solução contendo $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de corante.

Fonte: Autora do trabalho.

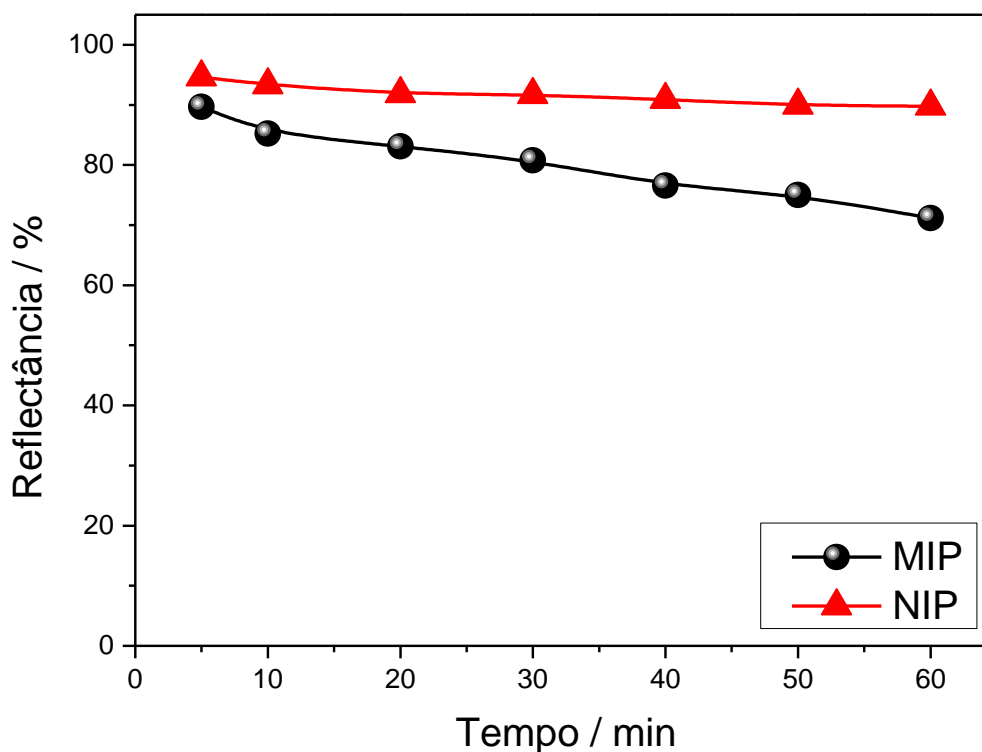


Figura 38 - Curvas da reflectância em função do tempo, a 640 nm. Dados extraídos da Figura 37.
Fonte: Autora do trabalho.

As curvas analíticas mostraram que os polímeros possuem mais tendência em aderir os analitos conforme mais tempo é realizada a incubação, mostrando que o melhor tempo de religação é o de 60 minutos. No qual o MIP interagiu muito melhor conforme foi passando o tempo, já para o NIP, observa-se que o valor da reflectância praticamente é inalterado depois 20 minutos.

Contudo, mesmo que 60 minutos tenha sido o melhor tempo para a interação, ainda assim, é um tempo de análise muito longo para aplicação dos sensores, uma vez que é feita uma medida por vez, levando muitas horas para fazer uma análise. Portanto, escolheu-se neste trabalho um tempo de 10 minutos de interação, porque é um tempo mais curto e ainda assim garante uma boa religação dos polímeros, assim como uma adequada sensibilidade. Adicionalmente, se necessário aumentar a sensibilidade do método, o tempo de 60 min poderá ser uma alternativa para amostras muito diluídas.

4.3.2. Efeito da temperatura na interação entre o MIP-optodo e o corante

A seguir, são mostrados os resultados dos experimentos realizados em temperaturas diferentes à do ambiente, a fim de se avaliar como a adsorção/reliberação do corante é influenciada com a temperatura. Os resultados são mostrados nos espectros da Figura 39 e nas curvas da Figura 40.

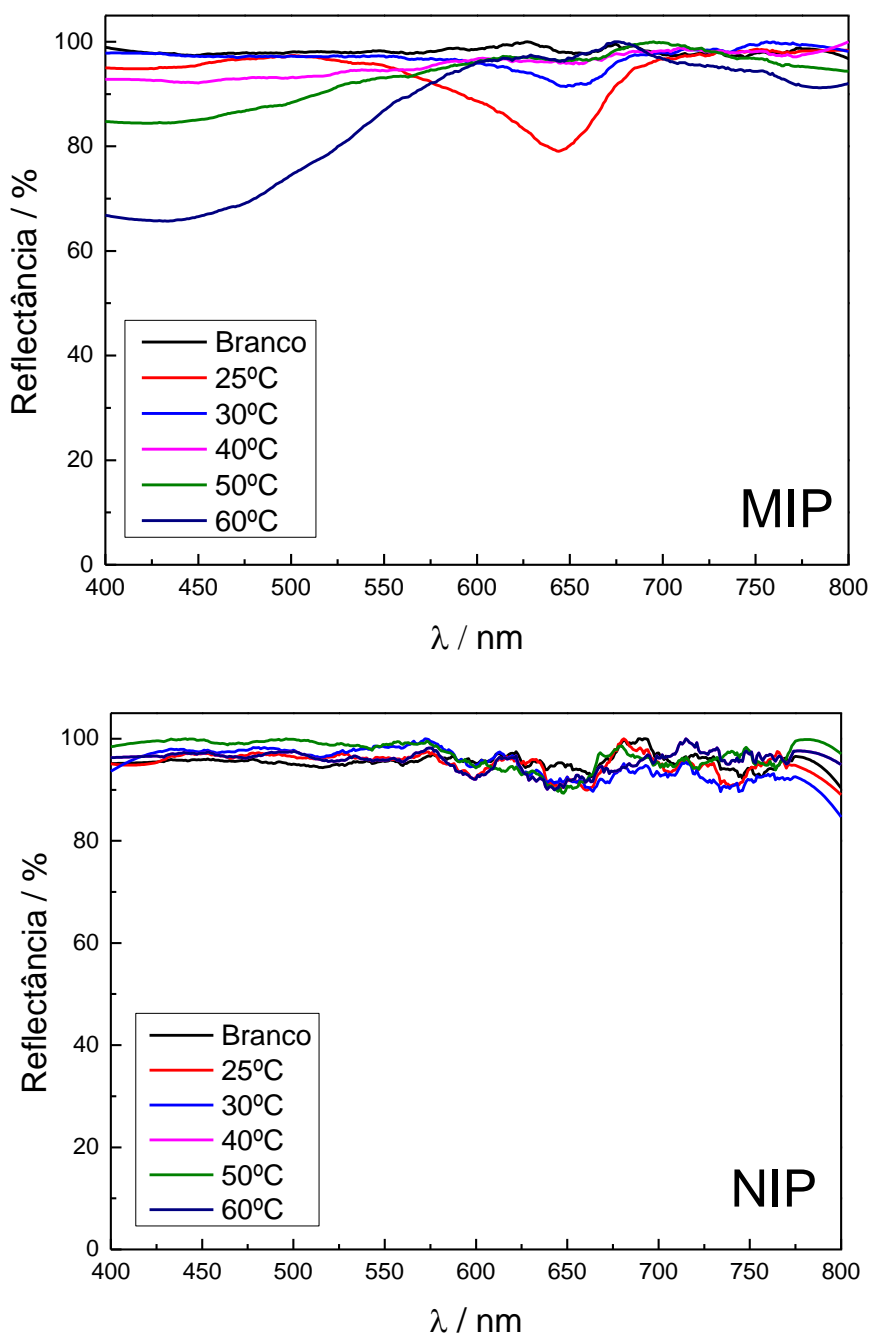


Figura 39 - Espectros de reflectância do corante AG16 dissolvido em água, na região UV-Vis para diferentes temperaturas empregando o MIP-optodo e o NIP-optodo para monitoramento.
Fonte: Autora do trabalho.

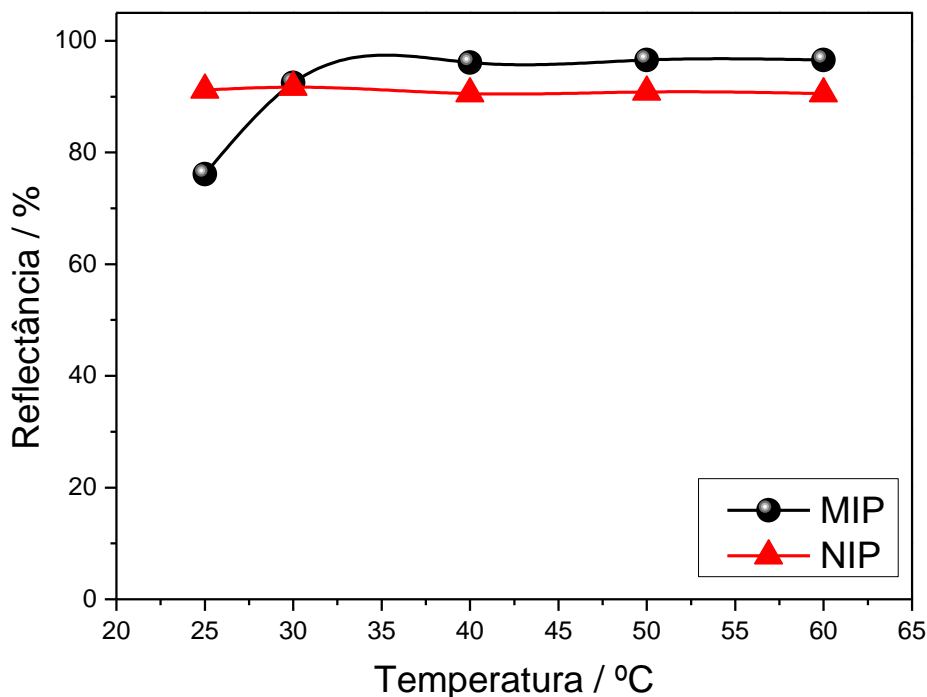


Figura 40 - Comparativo das duas curvas de temperatura dos polímeros. Gráfico obtido com os espectros da Figura 39.
Fonte: Autora do trabalho.

Como pode ser esperado, o MIP adsorveu muito mais corante na temperatura do ambiente (25 °C) enquanto nas temperaturas maiores, a adsorção foi menor e praticamente não houve variação. Portanto, o polímero foi negativamente afetado com o aumento da temperatura. O NIP teve pouca alteração, ou seja, adsorveu a mesma quantidade aproximada em todas as temperaturas, mostrando que ele é bem pouco afetado com as variações de temperatura, mostrando a ineficiência na adsorção do corante, tal como esperado.

A explicação para esse comportamento é simples: como o MIP tem cavidades seletivas com forma e tamanho definidos, o aumento da temperatura faz com que as moléculas do sítio de ligação vibrem mais, modificando e/ou distorcendo a cavidade seletiva de reconhecimento dificultando, ou ainda evitando, sua interação com o corante, além de também aumentar as vibrações da molécula do corante. Adicionalmente, o aumento de temperatura promoverá um aumento na solubilidade do analito, competindo com o fenômeno da adsorção em fase sólida necessária para o reconhecimento no sensor.

Por outro lado, conforme observado até aqui, o NIP não adsorve o corante por não possuir uma morfologia com cavidades definidas, e com isto o NIP-optodo é bem menos afetado pela variação da temperatura.

No espectro de reflectância do MIP mostrado na Figura 39, é observado o surgimento de uma nova banda 430 nm, que fica mais evidente em 50 e 60 °C. Para verificar a origem dessa banda foi registrado um espectro da absorbância do AG16 em solução aquosa, seguindo as mesmas condições de análise que foram realizadas anteriormente (Figura 41).

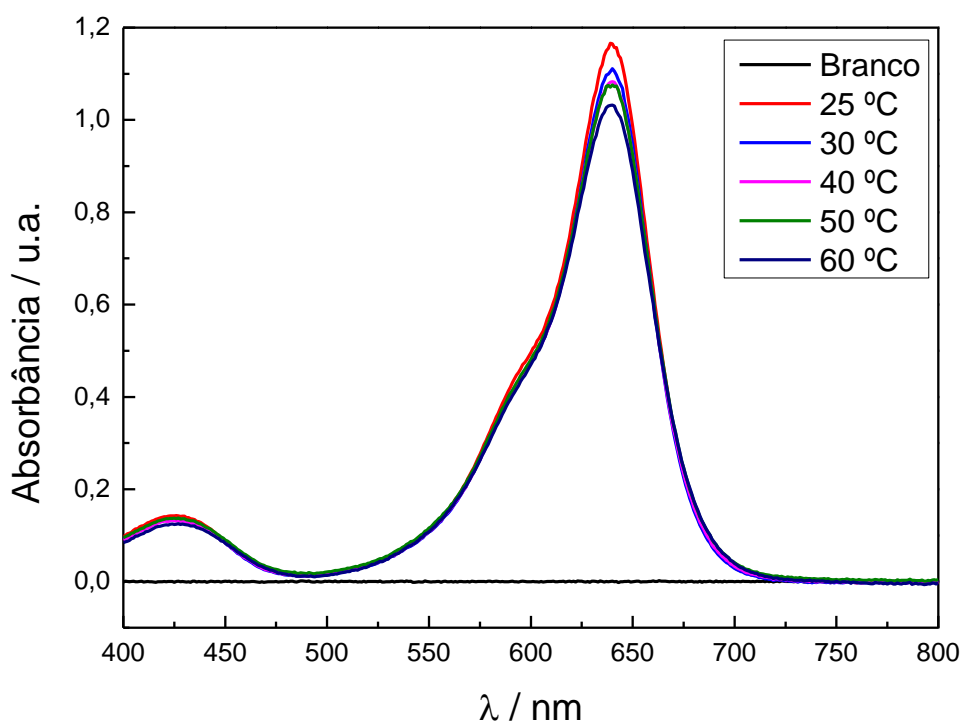


Figura 41 - Espectro da absorção do corante AG16 na região do UV-Vis, em água e medido em temperaturas diferentes.
Fonte: Autora do Trabalho.

Como pode ser observado, a intensidade da absorbância se alterou inexpressivamente com o aumento da temperatura, tampouco houve aumento de uma banda no comprimento de 430 nm, comprovando que o corante não se degrada nessas temperaturas. Desta forma, a temperatura usada nos experimentos subsequentes foi de 25 °C.

4.3.3. Avaliação do pH de medida

Tendo preparado as soluções com os valores de pHs pré-estabelecidos e realizadas as medidas de reflectância no espectrofotômetro, os resultados obtidos são mostrados nos gráficos das Figuras 42 e 43. Para o MIP-optodo e seu correspondente NIP-optodo, respectivamente.

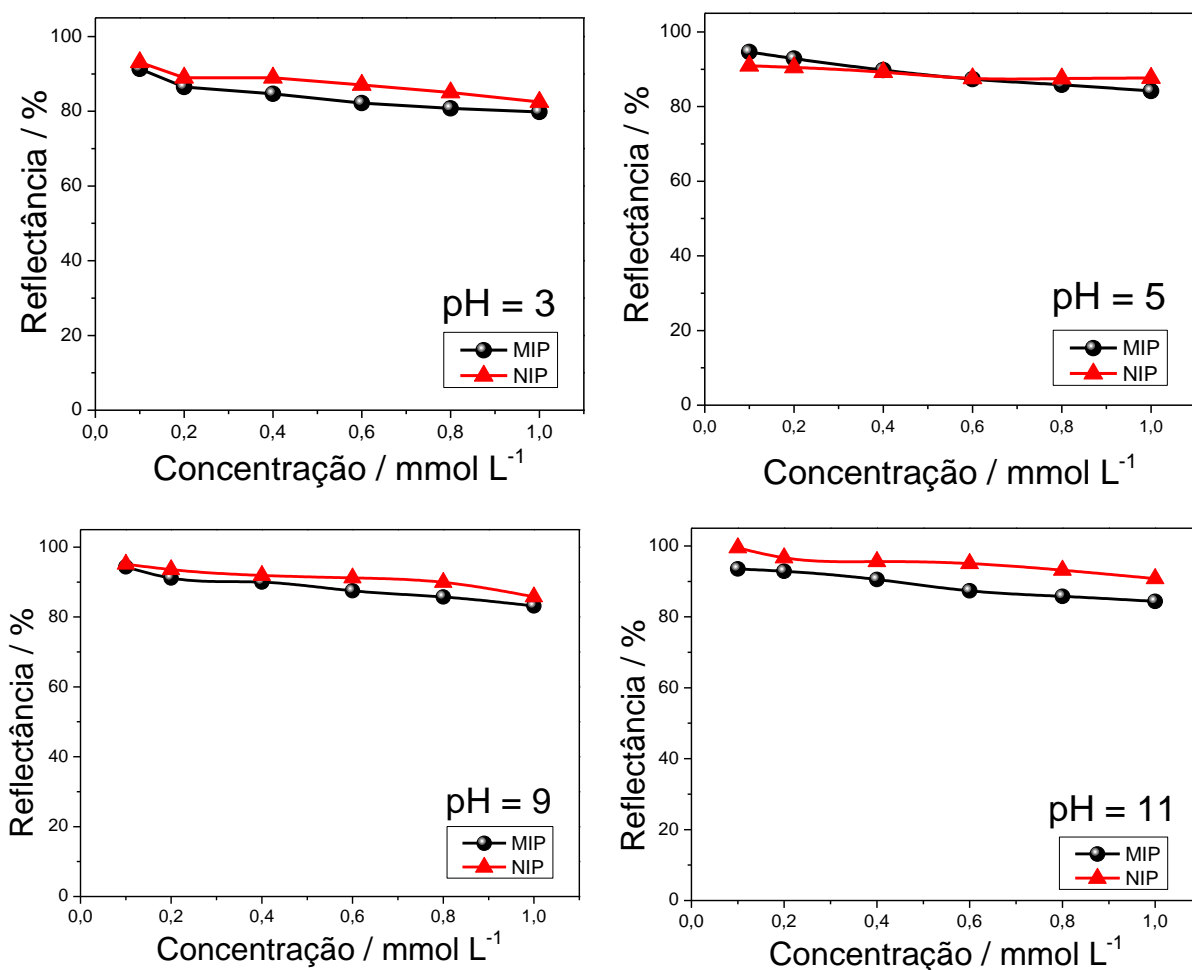


Figura 42 - Comparativo de todas as curvas analíticas da reflectância em função da concentração em soluções com diferentes valores de pH.

Fonte: Autora do trabalho.

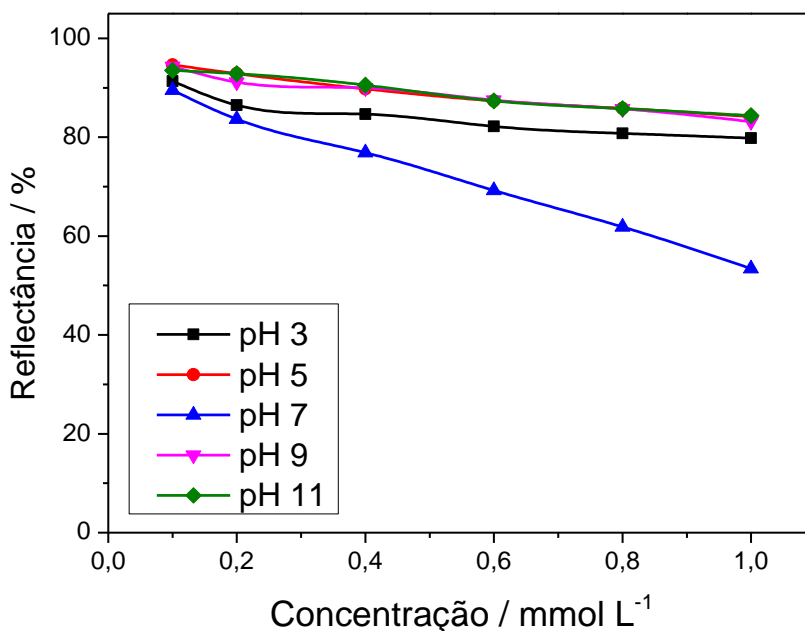


Figura 43 - Comparativo de curvas analíticas do MIP em todos os pH avaliados.
Fonte: Autora do trabalho

De acordo com o gráfico mostrado acima, a curva que apresentou maior variação da reflectância foi aquela obtida em solução com pH 7, e que pode ser explicado baseando na estrutura do corante AG16.

A molécula do AG16 possui dois grupos sulfonados e uma amina terciária (Figura 44). Pode-se inferir dos equilíbrios ácido-base mostrados na figura abaixo, que em soluções muito ácidas, os dois grupos sulfonados encontram-se protonados, enquanto que em soluções muito alcalinas, ambos os grupos sulfóxido estão desprotonados, tal como mostrado por Foguel, et al. [19].

Observa-se que em soluções com pH neutro apenas um dos grupos sulfonados estará protonado, enquanto a amina ainda mantém a carga positiva. Isso mostra que o pH da solução altera as interações entre o MIP e o analito, pois desloca a forma ionizada da molécula do corante.

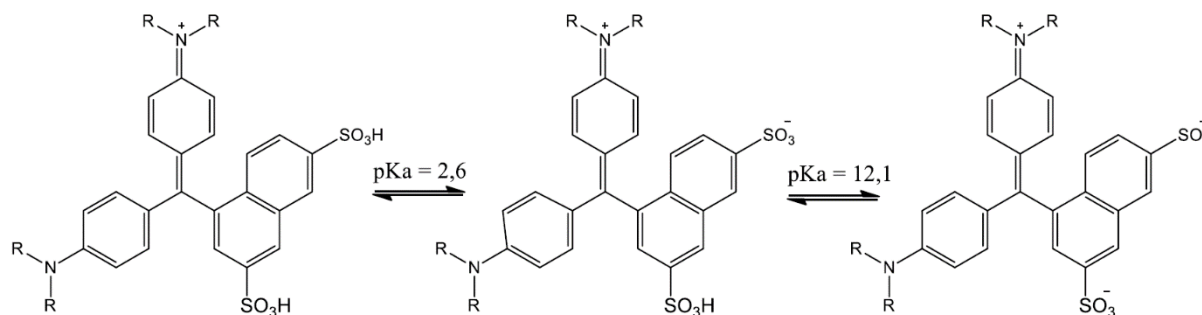


Figura 44 - Estruturas do AG16 em ressonância de acordo com o pH da solução.
Fonte: Foguel.

Portanto, em pH 7, a molécula apresentaria uma carga total neutra, e desta forma permitiria que as interações no sítio ativo do MIP sejam mais favorecidas, uma vez que poderiam ocorrer interações de hidrogênio entre o H do C-5 do 1-VI e o oxigênio desprotonado do grupo sulfóxido [19], assim como podem ocorrer interações $\pi \rightarrow \pi$ entre as duplas ligações presentes em ambas as moléculas (1-VI e analito), apresentando-se com maior eficiência em soluções neutras, pois é possível minimizar as interações paralelas devido à solvatação, causadas pela presença de íons H^+ e OH^- , em soluções ácidas ou alcalinas.

4.3.4. Perfil de resposta do sensor em diferentes concentrações de corante

Após realizar os experimentos para otimização do optodo, foi avaliado o perfil de resposta do sensor para estimar o limite de detecção e de quantificação do método proposto, nas condições previamente modificadas. Os resultados obtidos estão mostrados nos espectros de reflectância da Figura 45.

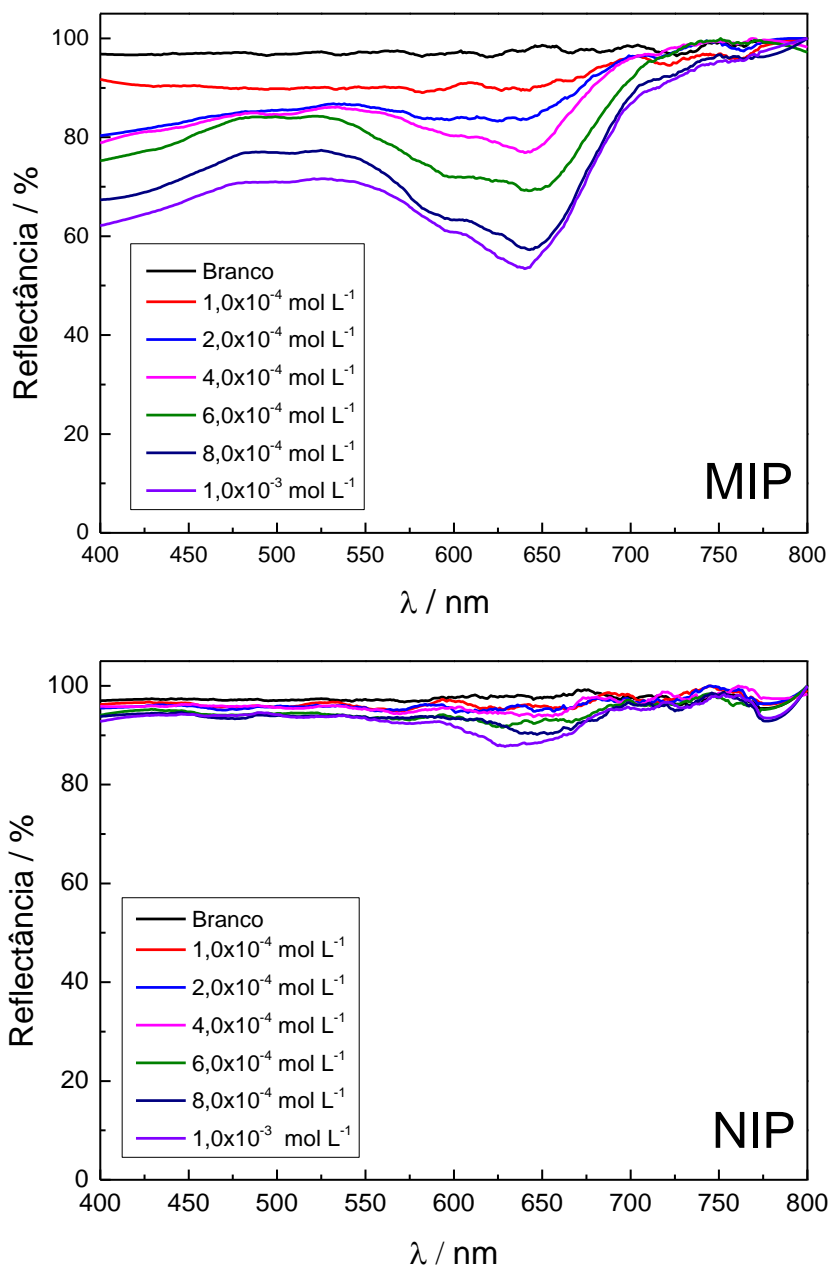


Figura 45 - Espectros de reflectância na região UV-Vis para diferentes concentrações do corante AG16 dissolvido em água empregando a fibra óptica para monitoramento, nas condições previamente otimizadas.

Fonte: Autora do trabalho.

Analisando os dois gráficos, observa-se uma maior variação da reflectância quando usado o MIP-optodo, indicando que o polímero impresso adsorveu mais analito do que o não impresso. Um resultado esperado e satisfatório, além disso, a adsorção foi aumentando conforme aumentou-se a concentração do corante.

Essa observação pôde ser mais bem evidenciada na construção de uma curva analítica da reflectância em relação à concentração. Os valores da reflectância

absoluta foram coletados no comprimento de onda 640 nm dos espectros da Figura 45. As curvas obtidas estão apresentadas na Figura 46.

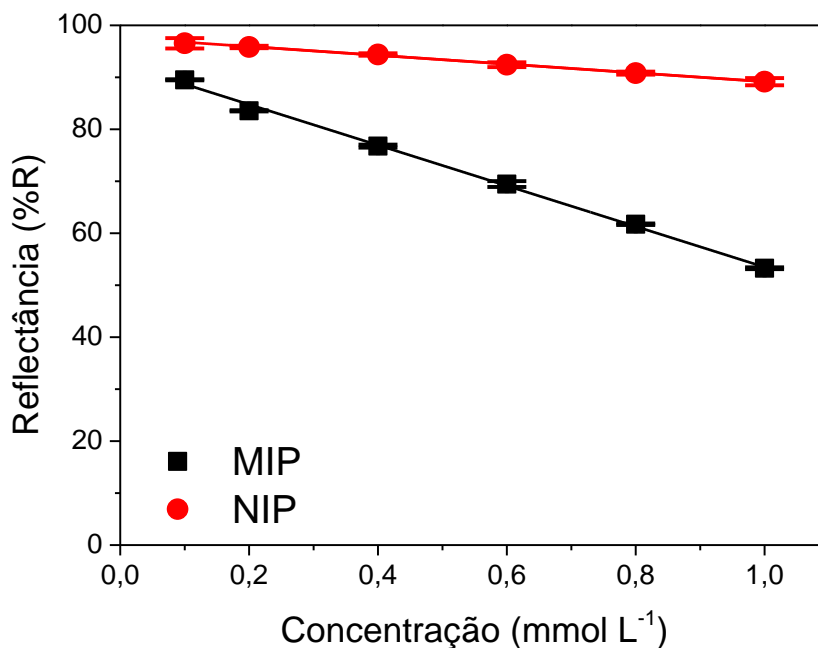


Figura 46 - Curva analítica da reflectância em função da concentração a 640 nm ($n = 3$).
Fonte: Autora do trabalho.

As curvas analíticas apresentaram linearidade, com um coeficiente de regressão de $r^2=0,9980$, enquanto que para o NIP-optodo foi de $r^2=0,9986$, o que, portanto, permite discernir que polímero impresso adsorveu o corante de forma quantitativa, conforme foi ficando mais concentrado. As equações das curvas analíticas dos dois sensores à base dos polímeros são mostradas abaixo:

$$y_{MIP} = 92,60 - 39,1 \cdot x_{MIP} \quad (2)$$

$$y_{NIP} = 97,62 - 8,43 \cdot x_{NIP} \quad (3)$$

Onde y corresponde à %R medida e x corresponde à concentração de corante em mmol L^{-1} .

Com as equações da regressão linear obtidas, foi possível encontrar os coeficientes angulares e lineares para ambos os polímeros e, também com o valor da sensibilidade (s) e usando a relação $3\delta_B/s$ foi possível calcular os limites de

detecção e, conseqüentemente o de quantificação do sensor. Todos esses valores são mostrados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Dados dos parâmetros obtidos nas curvas analíticas dos polímeros MIP e NIP.

Parâmetros	MIP-sensor	NIP-sensor
Faixa de resposta (mmol L^{-1})	0,1 – 1,0	0,2 – 1,0
Coeficiente angular (sensibilidade)	-39,1	-8,43
Coeficiente Linear	92,60	97,61
Limite de Detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	32,9	227
Limite de Quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	109	750

Fonte: Autora do trabalho.

Ao comparar as duas curvas, ficou evidente que o MIP adsorveu muito mais o analito do que o NIP, comprovando a capacidade seletiva do polímero impresso. Além disso, a diferença de reflectância aumentou conforme foi aumentando a concentração, mostrando que o MIP tem uma tendência de religação com o AG16 muito maior e mais forte do que com o NIP. Mostrando a viabilidade do MIP-optodo proposto.

4.3.5. Estudos da capacidade de repetibilidade do MIP-optodo

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medidas feitas sucessivamente de um mesmo método. Essas medidas são realizadas sob as mesmas condições de procedimento, mesmo analista e equipamento/instrumento, utilizando os mesmos parâmetros como temperatura, pH, tempo e concentração. Todas as medidas e repetições são feitas em um curto intervalo de tempo [59].

No espectrofotômetro, foram feitas 10 medidas consecutivas para cada concentração nos MIP-optodo e NIP-optodo, sob as mesmas condições utilizadas para encontrar a curva analítica. Tendo obtido esses valores, foram calculadas as médias das concentrações, junto com o Desvio Padrão e o Desvio Padrão Relativo (RSD), cujo cálculo é mostrado na Equação 4.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} 100 \quad (4)$$

Onde “s” é o Desvio Padrão e “ \bar{x} ” é a média dos valores, o valor do RSD é dado em porcentagem.

Os resultados calculados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores calculados da média das reflectâncias, desvio padrão e desvio padrão relativo para n = 10.

	Concentração (mmol L ⁻¹)	Reflectância Média (%)	Desvio Padrão	RSD
MIP	0,1	97,35	0,6194	0,64%
	0,2	94,16	0,4595	0,49%
	0,4	89,75	0,4675	0,52%
	0,6	84,43	0,4401	0,52%
	0,8	79,34	0,3785	0,48%
	1,0	73,40	0,3572	0,49%
NIP	0,1	97,46	1,403	1,44%
	0,2	96,92	0,9275	0,96%
	0,4	95,51	0,4818	0,50%
	0,6	93,95	0,4853	0,52%
	0,8	92,81	0,8752	0,94%
	1,0	91,09	0,3656	0,40%

Fonte: Autora do trabalho.

Com as médias das reflectâncias obtidas, foi possível construir o gráfico da curva da reflectância em função da concentração, mostrado na Figura 47.

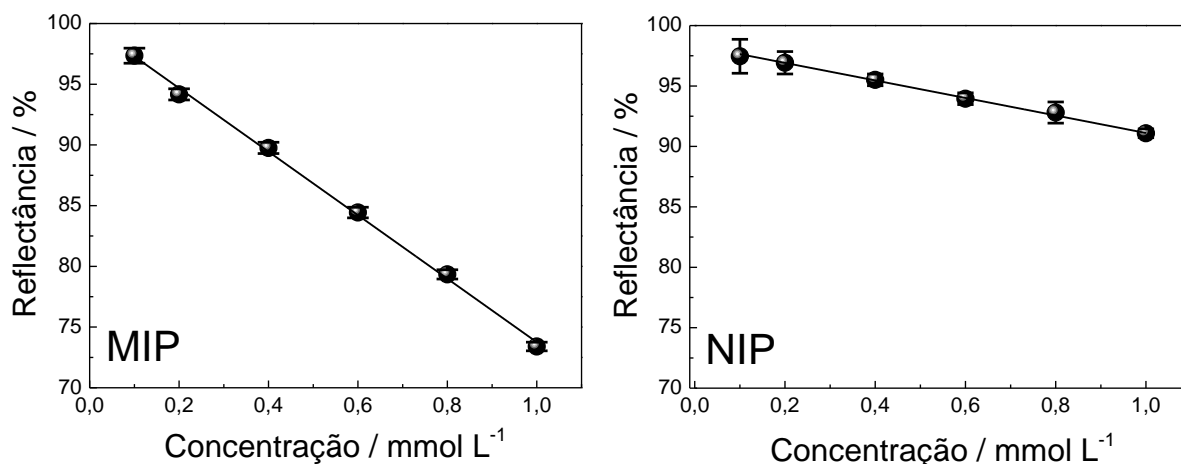


Figura 47 - Gráficos da média das 10 reflectâncias em função da concentração junto com o desvio padrão, para cada um dos polímeros.
Fonte: Autora do trabalho.

As equações das curvas analíticas obtidas e ajustadas respectivamente com valores de coeficientes de linearidade (R) de 0,9991 e 0,9993, são descritas a seguir:

$$y_{MIP} = 99,9(\pm 0,4) - 26,2(\pm 0,6) \cdot x_{MIP} \quad (5)$$

$$y_{NIP} = 98,4(\pm 0,1) - 7,29(\pm 0,15) \cdot x_{NIP} \quad (6)$$

Os resultados mostrados acima evidenciam que, tanto o MIP-optodo quanto o NIP-optodo apresentaram um desvio padrão relativo abaixo de 4%, o que é um resultado positivo e promissor, sendo que o MIP foi ainda mais eficiente, mostrando que as fibras apresentam repetibilidade.

4.3.6. Estudos da capacidade de reprodutibilidade do MIP-optodo

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma única amostra sob condições variadas como equipamento, material, local, analista, etc. [59]. Nesse experimento, a reprodutibilidade foi aplicada utilizando três MIP-optodos e NIP-optodos diferentes, nas mesmas amostras sob as mesmas condições realizadas nos experimentos anteriores.

A Tabela 3 apresentada a seguir, mostra os resultados obtidos junto com as médias e os desvios calculados. Em seguida, são apresentados os gráficos da média das reflectâncias das fibras em função da concentração na Figura 48.

Tabela 3 - Valores calculados das reflectâncias das fibras e as suas médias, desvio padrão e desvio padrão relativo para n = 3.

	Concentração (mmol L ⁻¹)	Reflectância (%)				Desvio Padrão	RSD
		Fibra 1	Fibra 2	Fibra 3	Média		
MIP	0,1	95,86	90,35	96,28	94,17	3,310	3,51%
	0,2	92,23	86,59	92,87	90,56	3,452	3,81%
	0,4	84,48	79,48	84,75	82,90	2,970	3,58%
	0,6	76,50	72,39	76,84	75,24	2,478	3,29%
	0,8	68,86	67,23	68,33	68,14	0,8292	1,22%
	1,0	60,73	60,70	60,91	60,78	0,1155	0,19%
NIP	0,1	98,66	99,59	95,30	97,85	2,257	2,31%
	0,2	97,66	99,21	94,30	97,06	2,507	2,58%
	0,4	95,10	97,00	92,48	95,16	2,374	2,49%
	0,6	94,34	95,37	90,31	93,33	2,662	2,85%
	0,8	92,71	93,25	88,33	91,43	2,697	2,95%
	1,0	91,09	91,90	86,77	89,92	2,755	3,06%

Fonte: Autora do trabalho.

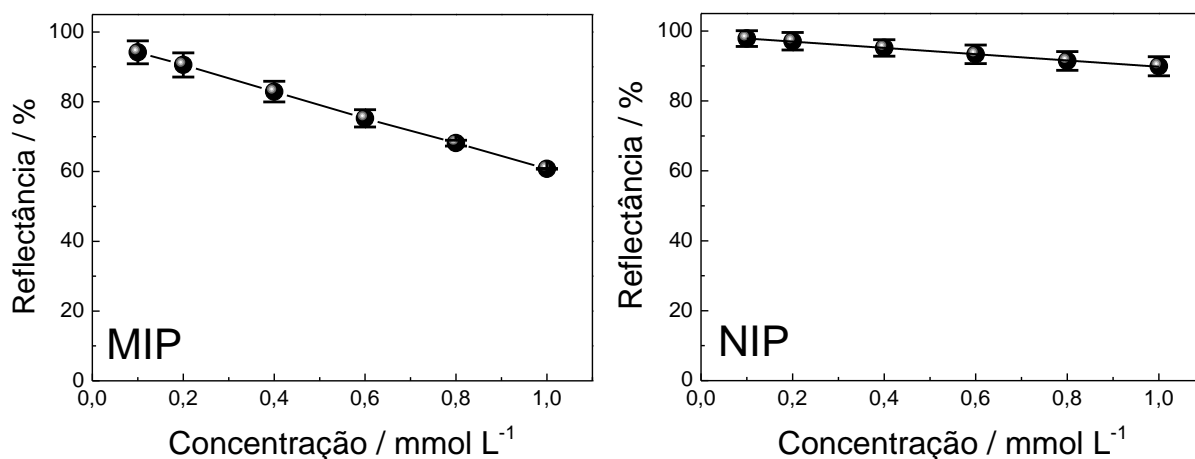


Figura 48 - Gráficos da média das reflectâncias em função da concentração junto com o desvio padrão, para cada um dos polímeros.
Fonte: Autora do trabalho.

As equações das curvas analíticas obtidas e ajustadas respectivamente com valores de coeficientes de linearidade (R) de 0,9991 e 0,9993, são descritas a seguir:

$$y_{MIP} = 97,7(\pm 0,2) - 36,9(\pm 0,2) \cdot x_{MIP} \quad (7)$$

$$y_{NIP} = 98,8(\pm 0,1) - 9,0(\pm 0,2) \cdot x_{NIP} \quad (8)$$

Os resultados dos experimentos de reprodutibilidade apresentaram-se tão eficientes quanto os de repetibilidade. Com um RSD baixo para ambos os optodos, sendo ainda menor para sensor à base de polímero impresso.

4.3.7. Avaliação da seletividade

Tendo sido o MIP-optodo otimizado em relação à construção e análise, a seguinte etapa de estudo foi a avaliação da seletividade do sensor proposto, utilizando quatro corantes diferentes: Vermelho Ácido 1 (AR1), Violeta Direto 51 (DV51), Vermelho Ácido 114 (AR114) e Amarelo Direto 50 (DY50). Com a mesma metodologia de análise e medida utilizada na construção da curva analítica, os resultados obtidos são mostrados a seguir nas Figuras 49 e 50.

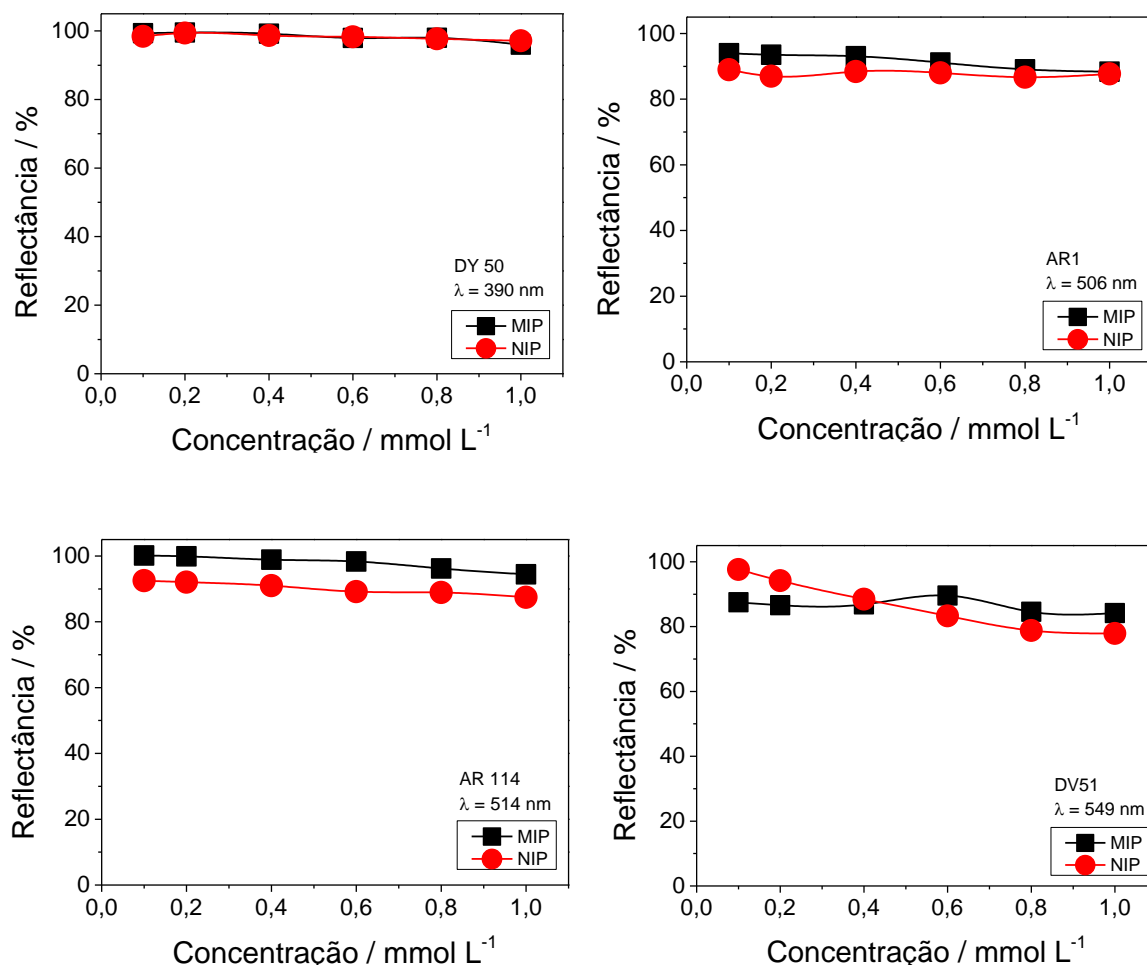


Figura 49 - Comparativo de todas as curvas analíticas da reflectância em relação à concentração para cada corante com seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorvância.

Fonte: Autora do trabalho.

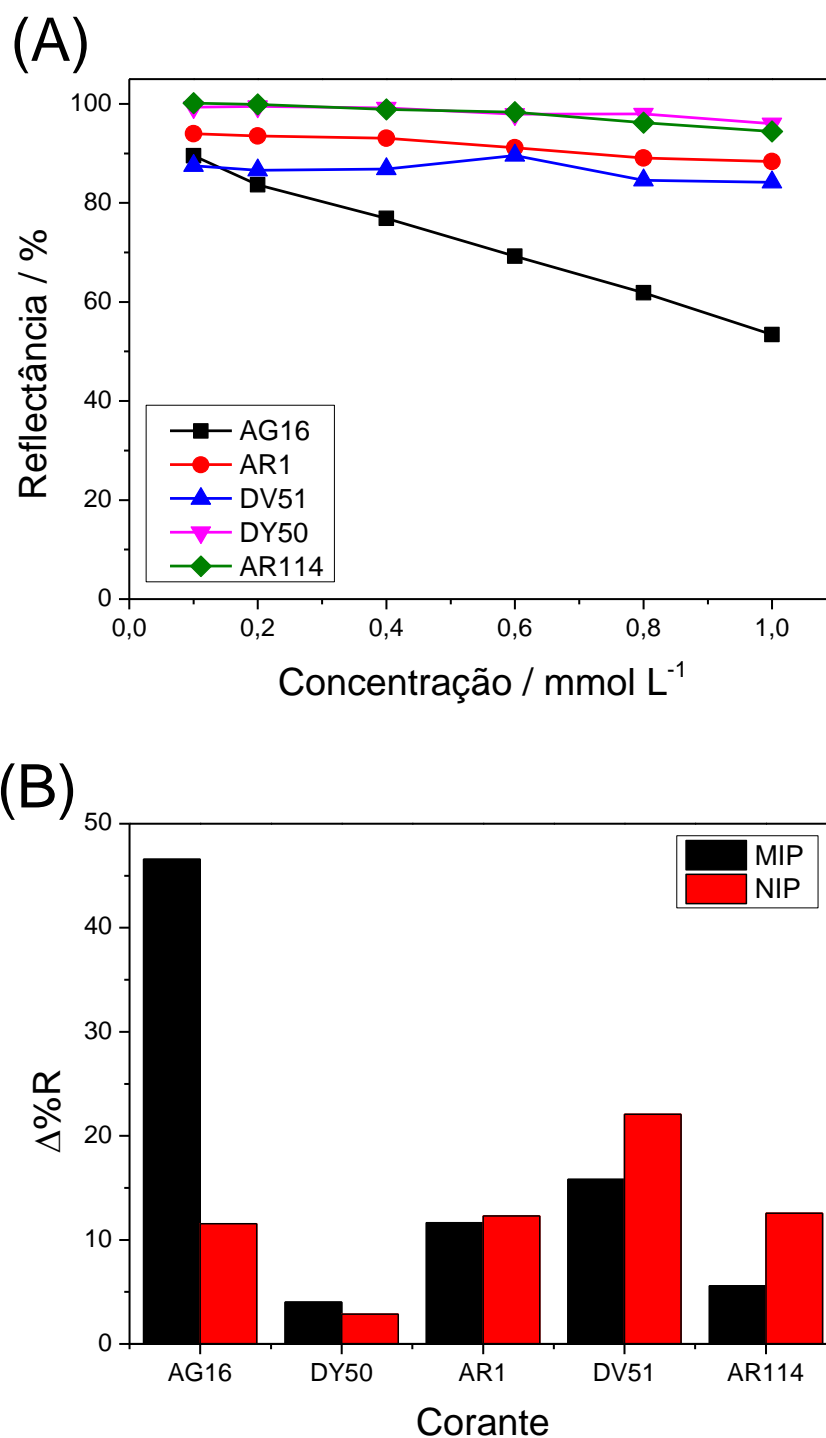


Figura 50 - Comparativa das curvas analíticas da reflectância em função da concentração do MIP em todos os corantes (A). Comparativo da variação da reflectância entre MIP e NIP de na concentração de 1 mmol L⁻¹ (B).

Fonte: Autora do trabalho.

Para avaliar a seletividade do sensor em termos numéricos foram calculados o fator de impressão molecular (α) e o fator de seletividade (β) usando as Equações 5 e 6 a seguir, conforme relatado na literatura para sensores químicos à base de polímeros molecularmente impressos [60].

$$\alpha = \frac{\Delta\%R (MIP)}{\Delta\%R (NIP)} \quad (9)$$

$$\beta = \frac{\alpha (AG16)}{\alpha (interferente)} \quad (10)$$

Obtendo-se os resultados da Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros relacionados à seletividade do sensor proposto em comparação como o NIP-optodo para seu analito principal AG16 e os possíveis interferentes avaliados.

Corantes	Variação da reflectância ($\Delta\%R$)		Parâmetros da seletividade	
	MIP-optodo	NIP-optodo	α (MIP,NIP)	β (analito, interferente)
AG 16	49,6	10,7	4,64	-----
DY50	4,0	2,8	1,43	3,24
AR1	10,9	13,3	0,82	5,66
DV51	15,4	21,2	0,72	6,44
AR114	5,6	12,6	0,44	10,6

Fonte: Autora do trabalho.

O fator de impressão molecular é dado pela razão entre o valor absoluto da reflectância ($\%R$) do MIP e o valor do NIP. Isso significa que, quanto maior for o valor desse fator, maior será a diferença de reflectância entre o polímero impresso e o não impresso [61]. Um valor alto e maior que 1, como foi mostrado na Tabela 4, significa que o MIP-optodo adsorveu corante analito muito mais em relação ao NIP-optodo, um resultado positivo e satisfatório.

No caso dos corantes interferentes, foi possível observar que houve uma resposta maior ou igual no NIP-optodo, sendo que o fator de impressão molecular teve um valor relativamente baixo ou próximo de 1, indicando que não houve diferença de interação entre os polímeros. Isso evidencia um resultado esperado,

pois mostrou que o MIP foi eficientemente seletivo com o seu corante analito AG16 em relação aos demais corantes. Cabe ressaltar, que a adsorção dos interferentes não foi quantitativa conforme foi aumentando a concentração.

Para o fator de seletividade, o valor é dado pela razão entre os fatores de impressão molecular do corante analito e de um corante interferente. Se o valor desse fator for maior do que 1, significa que o material possui uma seletividade maior para com o analito em relação ao interferente. Quanto mais alto for o fator de seletividade, mais seletivo será o MIP-optodo com seu corante e melhor será o resultado [62].

Como foi mostrado na Tabela 4, todos os fatores de seletividade dos corantes interferentes foram altos e maiores do que 1, indicando que houve seletividade do MIP-optodo para a detecção do Verde Ácido 16.

O corante DV51, apesar de ter apresentado um comportamento anormal, isso foi devido à sua alta facilidade em se aderir na superfície de vidro da fibra óptica, dificultando a lavagem antes de realizar a medida (etapa (ii) do protocolo de medidas). Entretanto, esse corante não influenciou na seletividade do sensor, mostrando um alto valor de β , como consequência das interações não-específicas observadas no NIP-sensor.

4.4. Aplicação do MIP-optodo em amostras de efluentes e de resíduos industriais

A fim de verificar a interação entre optodo e analito frente a amostras reais, foram realizados experimentos em amostras de efluentes de resíduos industriais. Com todos os parâmetros devidamente otimizados e tendo os materiais caracterizados.

Foram selecionadas 2 tipos de amostras, sendo uma delas retirada de um rio da cidade de Araraquara: Rio Jacaré-Guaçu. A outra amostra corresponde a um resíduo industrial de uma fábrica em fase de pré-tratamento: uma amostra concentrada e a outra diluída em 50 vezes.

A amostra de rio foi contaminada com 3 concentrações pré-estabelecidas de corante AG16: 0,2; 0,4 e 0,6 mmol L⁻¹, e para a amostra da indústria têxtil foi usada a concentração de 0,2 mmol L⁻¹. Nenhum outro tratamento foi aplicado durante os

preparos da amostra. Com os parâmetros anteriormente otimizados, as amostras foram aplicadas com 60 minutos de tempo de interação, temperatura do ambiente ($\pm 25^\circ \text{C}$) e pH próximo de 7.

Os resultados da percentagem de reflectância obtidos foram mostrados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5 - Tabela com os valores das reflectâncias obtidas das amostras de efluentes.

Concentração (mmol L^{-1})	Reflectância (%)			
	Jacaré-Guaçu			
	MIP		NIP	
0,2	82,30		95,28	
0,4	76,42		92,55	
0,6	55,81		90,33	
Concentração (mmol L^{-1})	Resíduo (cru)		Resíduo x50	
	MIP	NIP	MIP	NIP
	0,2	95,87	97,26	84,61

Fonte: Autora do Trabalho.

Para avaliar o desempenho dos optodos nas amostras reais, foi calculado a Porcentagem de Recuperação, que é a medida percentual da interação entre analito e optodo que é recuperada após se misturarem na matriz de uma amostra real. A equação da Porcentagem de Recuperação é dada pela razão entre a variação da reflectância nas amostras reais, e a variação da reflectância na curva analítica.

$$\text{Porcentagem de Recuperação} = \frac{\Delta\%R_{\text{Amostra}}}{\Delta\%R_{\text{Curva Analítica}}} \times 100\% \quad (7)$$

Vale lembrar que o valor da variação da reflectância é dado pela diferença entre a reflectância do branco e o medido numa determinada concentração. Se a recuperação for menor do que 100%, significa que a capacidade de interação entre analito e optodo foi menor na matriz amostral, se for maior do que 100%, significa que a interação foi maior.

A Tabela 6 a seguir, mostra os resultados dos valores da Porcentagem de Recuperação encontrados para cada amostra.

Tabela 6 - Tabela com os valores das Porcentagens de Recuperação para cada amostra de efluente.

Concentração (mmol L ⁻¹)	Porcentagem de Recuperação (%)			
	Jacaré-Guaçu			
	MIP		NIP	
0,2	103,7		146,9	
0,4	98,83		157,7	
0,6	142,1		146,1	
Concentração (mmol L ⁻¹)	Resíduo (cru)		Resíduo x50	
	MIP	NIP	MIP	NIP
	0,2	24,76	86,33	93,53

Fonte: Autora do trabalho.

Analisando os valores das porcentagens calculados na Tabela 6, observou-se que em quase todas as amostras analisadas do rio, houve uma porcentagem de recuperação próxima de 100% para o MIP-sensor, com exceção da amostra contendo 0,6 mmol L⁻¹ de AG16 no Rio Jacaré-Guaçu, para o qual obtiveram-se resultados com mais de 100% de recuperação. A explicação para esse resultado pode ser porque provavelmente já havia presença de AG16 na amostra do rio e que nesta concentração já pode ser detectada pelo sensor. Adicionalmente, pode se observar que o NIP-sensor apresenta interações não específicas, próprio de sua natureza não seletiva, mostrando valores de recuperação em todos os casos maiores que os do MIP-sensor.

Para a amostra de efluente industrial (cru) na qual não houve nenhum pré-tratamento, a explicação para um valor de recuperação tão baixo é devido ao efeito da matriz, cujos componentes da amostra contendo particulados e outros resíduos pode ter bloqueado as cavidades e poros do MIP (mais poroso) e do NIP (menos poroso) interferindo na medida da reflectância. Já na amostra diluída em 50 vezes, o valor da porcentagem foi próximo a 100%, mostrando a eficiência do sensor proposto quando comparada ao NIP-sensor. Cabe ressaltar que o efluente cru, era de aparência escura, como consequência da grande mistura de corantes, ao diluir a amostra em 50 vezes, a mesma ficou com uma aparência mais límpida, diluindo os interferentes e permitindo um valor de recuperação melhor.

A aplicação do sensor proposto baseado em MIP seletivo ao corante AG16 mostra a viabilidade do método desenvolvido para aplicação em amostras de interesse ambiental.

5. CONCLUSÕES

Com a realização desse trabalho, foi possível desenvolver de ***forma inédita*** um MIP-optodo através da imobilização covalente por silanização de fibras ópticas de vidro funcionalizadas com o reagente 3-metacriloxipropiltrimetoxissilano (MPS) sobre as quais foi realizada a polimerização de um polímero molecularmente impresso para o corante Verde Ácido 16, obtendo-se resultados satisfatórios. Os quais foram validados em relação a um NIP-optodo e em relação a outros corantes.

Nos estudos de caracterização morfológica dos materiais poliméricos em pó e imobilizados, a Microscopia Eletrônica de Varredura permitiu verificar que mesmo nas fibras ópticas, a morfologia do MIP e NIP é preservada. Na caracterização do MIP-sensor por FTIR, as bandas observadas comprovaram a presença do polímero na fibra óptica, assim como a presença do agente silanizante imobilizado na fibra limpa. Em relação aos experimentos realizados com os polímeros em pó usando ATR, estes mostraram-se promissores, mas ainda precisam ser otimizados e melhorados, entretanto, é evidente a potencialidade do método para caracterização da adsorção de moléculas coloridas na superfície de polímeros impressos e não impressos.

Nos experimentos feitos com as placas de vidro na microscopia Confocal, evidenciou com maior exatidão a característica porosa do MIP, enquanto o NIP mostrou-se mais liso e compacto.

Ao analisar a capacidade de religação do MIP-optodo com o analito, o polímero impresso apresentou uma grande eficiência na determinação do corante, uma vez que o MIP mostrou uma boa religação graças às cavidades seletivas frente aos demais corantes interferentes, sendo mais eficiente em pH neutro e na temperatura do ambiente.

O sensor foi otimizado e o limite de detecção do corante esteve na ordem de $32,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto o limite de quantificação foi $109 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nos estudos de repetibilidade e reprodutibilidade, todos os resultados apresentaram um RSD abaixo de 4%, sendo este um excelente resultado da confiabilidade do sensor, tanto nas medidas quanto na reprodutibilidade da polimerização na construção dos optodos.

Nos estudos da seletividade do sensor proposto, foi possível calcular os parâmetros α e β , obtendo-se valores que demonstraram que o MIP-sensor construído é altamente seletivo para o corante analito em relação aos demais interferentes.

Por fim, ao aplicar o MIP-sensor em amostras reais de efluentes, os resultados mostraram-se com uma boa porcentagem de recuperação, mesmo sob efeito da matriz da amostra, indicando a funcionalidade do material sem precisar de um pré-tratamento elaborado das amostras.

6. REFERÊNCIAS

1. CHRISTIE, R. M. **Colour Chemistry**. Galashiels: RSC Paperbacks, 2001. 205 p.
2. GOLDING, M.; WHITE, D. **Guia de Cores – Para Web Designers**. São Paulo: Quark, 1977. 211 p.
3. GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**. 2000, v. 23, n. 1, p. 71-78, 31 Mar. 1999.
4. PEZZOLO, D. B. **Tecidos: história, tramas e usos**. São Paulo: Ed. Senac São Paulo, 2007. 324 p.
5. PINTO, A. C.; O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 608-615, 4 Set. 1995.
6. COSTA, A. M. M. Mauveína, a cor que mudou o mundo. **Sociedade Portuguesa de Química**, n. 105, p. 31-35, 2007.
7. LIMA, A. L. dos S.; PEREIRA, M. H. G.; PINTO, L. H. P. A. da C. Corantes sintéticos: a química das cores. **Revista Química Têxtil**. Disponível em: <<http://www.abqct.com.br/artigost/artigoesp14.pdf>>. Acesso em: 26 de setembro de 2018.
8. PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n.2, p. 237-250, 2003.
9. FOGUEL, M. V.; PEDRO, N. T. B.; WONG, A.; KHAN, S.; ZANONI, M. V. B.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective adsorption and quantification of Acid Green 16 textile dye in water samples. **Talanta**, v. 170, p. 244-251, 7 Abr. 2017.
10. ZOLLINGER, H. **Color chemistry: synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 1991. 637 p.
11. YAGUB, M.T., SEN, T.K., AFROZE, S., ANG, H.M. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, n. 209, p. 172-184, 13 Apr. 2014.
12. SIILVA JUNIOR, H.; FREITAS, G. R. S.; NÉRI, D. R. F.; PEREIRA, F. R. S.; FARIAS, R. F.; PEREIRA, F. C. Monitoramento do corante pararosanilina em amostras biológicas. **Eclética Química**, v. 35, n. 3, p. 147-156, 2010.
13. AZMI, W., SANI, R. K., BANERJEE, U. C. Biodegradation of triphenylmethane dyes. **Elsevier**, v. 22, p. 185-191, 15 Feb. 1998.
14. **Dye|World dye Variety. Acid green 16**. Disponível em: <<http://www.worlddyevariety.com/acid-dyes/acid-green-16.html>> Acesso em: 22 de maio de 2018.

15. **Sigma-Aldrich. Acid Green 16, ethyl form.** Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/18700?lang=pt®ion=BR>> Acesso em: 26 de setembro de 2018.

16. **CHRISTIE, R. M. Environmental aspects of textile dyeing.** Cambridge: Woodhead Publishing, 2007. 238 p.

17. **WRONSKA-NOFER, T.; WISNIEWSKA-KNYPL, J.; WYSZYNSKA, K.; DZIUBAŁTOWSKA, E.** Genotoxicity of industrial dyes under the inductive effect of ethanol on monooxygenase system in mice. **Mutation Research**, v. 392, p. 229-235, 1997.

18. **KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.** Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

19. **FOGUEL, M. V. Detecção e quantificação de corantes de importância ambiental empregando sensores químicos baseados em fibras ópticas e polímeros molecularmente impressos.** 2015. 188 f. Tese (Doutorado em Química) – UNESP, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

20. **SILVA, J. A. F.;** Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**. v. 26, n. 1, p. 56-64, 2003.

21. **SANTOS, L. O.;** **Estudo comparativo entre as técnicas de voltametria em pulso diferencial, espectrofotometria no ultravioleta e visível e cromatografia líquida de alta eficiência como metodologias analíticas no doseamento da substância química paracetamol.** 2003. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2003.

22. **FRANCO, D. L.;** **Eletropolimerização de aminofenóis para desenvolvimento de biossensores eletroquímicos aplicados à detecção de gene específico para câncer de próstata.** 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química. Uberlândia, 2007.

23. **TOH, S. Y.; CITARTAN, M.; GOPINATH, S. C. B.; TANG, T. H.** Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 64, p. 392-403, 2015.

24. **FIROOZ, A. R.; ENSAFI, A. A.; KAZEMIFARD, N.; KHALIFEH, R.** Development of a highly sensitive and selective optical sensor for determination of ultra-trace amount of silver ions. **Sensors and Actuators B; Chemical**, v. 176, p. 598-604, 13 Oct. 2012.

25. **HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F.** Chemical sensors definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, p.1247-1250, 1991.

26. **NEUMAN, M. R.** Physical and chemical sensors for medical instrumentation. **Medical Progress Technology**, v. 9, p. 95-104, 1982.

27. **BOSCH, M. E.; SÁNCHEZ, A. J. R.; ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B.** Recent development in optical fiber biosensors. **Sensors**, v. 7, p. 797-859, 4 Jun. 2007.

28. PINHEIRO, S. C. L.; RAIMUNDO-JR, I. M. Uso de membranas de nafion para a construção de sensores ópticos para medidas de pH. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 932-936, 13 Abr. 2005.

29. SOTOMAYOR, M. D. P. T. **Construção e Aplicação de Optodos em Sistemas Analíticos baseados em variações de pH**. 2000. 188 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

30. KHAN, S.; VILA, M.M.D.C.; TUBINO, M. Rapid determination of nitrites in food using a diffuse UV-visible reflectance method. **Food Additives & Contaminants. Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 29, n. 8, p. 1256-1262, 6 May. 2012.

31. ORELLANA, G.; HAIGH, D. New Trends in Fiber-Optic Chemical and Biological Sensors. **Curr. Analytical Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 273-295, 15 Jan. 2008.

32. TAN, S.-Z.; HU, Y.-J.; CHEN, J.-W.; SHEN, G.-L.; YU, R.-Q. An optical sensor based on covalent immobilization of 1-aminopyrene using Au nanoparticles as bridges and carrier. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 124, n. 1, p. 68-7, 28 Dec. 2006.

33. SOTOMAYOR, M. D. P. T.; RAIMUNDO-JR, I. M.; NETO, G. D. O.; OLIVEIRA, W. A. D. Evaluation of fiber optical chemical sensors for flow analysis system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 51, n. 1-3, p. 382-390, 31 Aug. 1998.

34. SOTOMAYOR, M. D. P. T.; RAIMUNDO-JR, I. M.; ZARBIN, A. J. G.; ROHWEEDER, J. J. R.; NETO, G. O.; ALVES, O. L. Construction and evaluation of an optical pH sensor based on polyaniline-porous Vycor glass nanocomposite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 74, n. 1-3, p. 157-162, 15 Apr. 2001.

35. KHAN, S. **Métodos simples e confiáveis para análise quantitativa de: (I) Nitrito em alimentos; (II) Pesticidas organofosforados; (III) Quantificação de metóxido de sódio em soluções em metanol**. 2013. 146 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

36. TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe(III), Cr(VI) and Ni(II) by reflectance measurements. **Analytical Letters**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 21 Aug. 2006.

37. TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 11 Jul. 2005.

38. HE, C.; LONG, Y.; PAN, J.; LI, K.; LIU, F. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 133–150, 3 Oct. 2006.

39. MOHAJERI, S. A.; KARIMI, G.; AGHAMOHAMMADIAN, J.; KHANSARI, M. R. Clozapine Recognition via Molecularly Imprinted Polymers; Bulk Polymerization

versus Precipitation Method. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 31, n. 3, p. 3590-3595. 12 Apr. 2011.

40. CARO, E.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.; GORMACK, P. A. G.; SHERRINGTON, D. C. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 143-154. 2006.

41. PICHON, V.; CHAPUIS-HUGON, F. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants – A review. **Analytica Chimica Acta**, n. 622, p. 48-61. 12 Jun. 2008.

42. PEÇANHA, B. R. B. **Síntese de polímeros de impressão molecular e sua aplicação na técnica de extração em fase sólida**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Monitoramento de Produtos para a Saúde) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

43. SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. Parte 1: síntese e caracterização. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1609-1619, 10 Ago. 2009.

44. CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 173-182, 2004.

45. TAMAYO, F. G.; TURIÉL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 32-40, 28 Sep. 2006.

46. FUCHS, Y.; SOPPERA, O.; HAUPT, K. Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 717, p. 7-20, 22 Dec 2011.

47. HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers in chemical and biological sensing. **Biochemical Society Transactions**, v. 27, p. 344-350, 23 Sep. 1998

48. MARAZUELA, M. D.; MORENO-BONDI, M. C. Fiber-optic biosensors – na overview. **Anal Bioanal Chem**, n. 372, p. 664-682, 21 Feb. 2002.

49. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Synthesis, characterization and kinetics of catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-aminopheno. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 820-825, 13 Mar. 2009.

50. **Sigma-Aldrich. 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440159?lang=pt®ion=BR>> Acesso em: 25 de outubro de 2018.

51. PAL, S.; KIM, M. J.; SONG, J. M. Quantitation of surface coverage of oligonucleotides bound to chip surfaces: a fluorescence-based approach using alkaline phosphatase digestion. **The Royal Society of Chemistry**, v. 8, p. 1332-1341, 6 Jun. 2008.

52. CHEN, W. H.; TSENG, Y. H.; HSIEH, S.; LIU, W. C.; HSIEH, C. W.; WU, C. W.; HUANG, C. H.; LIN, H. Y.; CHEN, C. W.; LIN, P. Y.; CHAU, L. K. Silanization of solid surfaces via mercaptopropylsilatrane: a new approach of constructing gold colloid monolayers. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 46527–46535, 2014.

53. **Direct Industry. Olympus.** Disponível em: <http://www.directindustry.com/pt/prod/olympus/product-17434-866189.html>. Acesso em: 18 de dezembro de 2018.

54. UZURIAGA-SÁNCHEZ, R. J.; KHAN, S.; WONG, A.; PICASSO, G.; PIVIDORI, M. I.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Magnetically separable polymer (Mag-MIP) for selective analysis of biotin in food samples. **Food Chemistry**, v. 190, p. 460-467. 1 Jan. 2016.

55. HUSSAIN, S.; KHAN, S.; GUL, A.; PIVIDORI, M. I.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. A novel core@shell magnetic molecularly imprinted nanoparticles for selective determination of folic acid in different food samples. **Reactive and functional polymers**, v. 106, p. 51-56. 25 Jul. 2016.

56. KHAN, S.; HUSSAIN, S.; WONG, A.; FOGUEL, M. V.; GONÇALVES, L. M.; GURGO, M. I. P.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Synthesis and characterization of magnetic-molecularly imprinted polymers for the HPLC-UV analysis of ametryn. **Reactive and functional polymers**, v. 122, p. 175-182. 7 Nov. 2017.

57. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Espectroscopia no Infravermelho. In: _____. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. Washington: Cengage Learning, 2010. Cap 2, p. 15-98.

58. Robinson, J. W. Infrared Spectroscopy. In: _____. **Practical Handbook of Spectroscopy**. Baton Rouge: CRC, 1991. Chap 5, p. 481-535.

59. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletrofiréticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780. 17 Jun. 2004.

60. BELUOMINI, M. A. **Sensores eletroquímicos para determinação de polióis na vinhaça de cana-de-açúcar baseados em eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos em grafeno contendo nanopartículas metálicas**. 2018. Tese (Doutorado em Química) – UNESP, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

61. ZANG, W.; SHE, X.; WANG, L.; FAN, H.; ZHOU, Q.; HUANG, X.; TANG, J. Z. Preparation, Characterization and Application of a Molecularly Imprinted Polymer for Selective Recognition of Sulpiride. **Materials**, v. 10, n. 475, p. 1-16. 28 Apr. 2017.

62. LI, H.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; LIAO, H.; NIE, L.; YAO, S.; Separation and purification of chlorogenic acid by molecularly imprinted polymer monolithic stationary phase. **Science Direct**, v. 1098, p. 66-74. 31 Aug. 2005.