

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Instituto de Química de Araraquara

Departamento de Química Analítica

Sara Manente Garcia

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM POLÍMEROS DE
IMPRESSÃO MOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO SENSÍVEL E
SELETIVA DE ÁCIDO FÓLICO**

Araraquara

2022

Autora: Sara Manente Garcia

Desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em nanopartículas magnéticas recobertas com polímeros de impressão molecular para determinação sensível e seletiva de ácido fólico

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Co-orientador: Dr. Ademar Wong

Colaborador: Dr. Sabir Khan

Araraquara

2022

SARA MANENTE GARCIA

Desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em nanopartículas magnéticas recobertas com polímeros de impressão molecular para determinação sensível e seletiva de ácido fólico

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Araraquara, 18/01/2022.

BANCA EXAMINADORA

DocuSigned by:

Maria del Pilar Sotomayor

B70E05453E35426...

Profa. Dra. Maria del Pilar Taboada Sotomayor

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

DocuSigned by:

Elias Monteiro Filho

B1B0422B6F67419...

Prof. Dr. Elias de Souza Monteiro Filho

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

DocuSigned by:

Leandro Martins

994E04BCB78348E...

Prof. Dr. Leandro Martins

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, saúde e bênçãos durante mais essa etapa.

À Universidade Estadual Paulista e ao Instituto de Química (Campus Araraquara), seus docentes e membros da direção e administração, por todas as oportunidades e conhecimentos científicos ofertados durante todo o período da graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro e institucional na realização do trabalho de pesquisa (Processo 2018/09432-4).

À Profa. Dra. Maria del Pilar Taboada Sotomayor, pelo cuidado, orientação, embasamento científico ofertado e, principalmente, grande incentivo (essenciais em todas as etapas deste trabalho).

Ao Prof. Dr. Ademar Wong e ao Prof. Dr. Sabir Khan pela paciência, pelo grande companheirismo e entusiasmo, além de todo conhecimento técnico e científico ofertado durante a pesquisa.

À minha mãe Elisabete, minha irmã Saneli e ao meu finado pai Milton, pelos inúmeros sacrifícios, pelo amor e apoio incondicionais. Também às minhas tias pelos conselhos que me levaram a acreditar mais em mim e em um futuro melhor.

Aos meus amigos, por me trazerem o amor e a leveza necessários em períodos de dificuldade e cansaço.

E por fim, a todos que participaram e contribuíram de alguma forma na minha formação.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um método analítico baseado em sistemas biomiméticos para determinação seletiva de ácido fólico. A construção do sistema biomimético se deu através do desenvolvimento dos polímeros molecularmente impressos, mais conhecidos como *MIPs* (*Molecularly Imprinted Polymers*), que foram sintetizados sobre nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) em um formato do tipo *core-shell*. As nanopartículas foram obtidas pelo método do poli-ol, o qual resultou em partículas monodispersas, uniformes, hidrofílicas, altamente cristalinas e coloidalmente estáveis. Os polímeros magnéticos molecularmente impressos (*mag-MIPs*) e os polímeros de controle ou não impressos (*mag-NIPs*) foram caracterizados morfolologicamente (por análises MEV, FTIR e BET) e submetidos a testes de religação com soluções de diferentes concentrações de ácido fólico a fim de checar seu desempenho analítico. Após comprovada a maior eficiência dos *mag-MIPs*, estes materiais foram utilizados como agentes modificadores, em conjunto com o óxido de grafeno (*GO*) no desenvolvimento de sensores eletroquímicos (sensor *mag-MIP-GO/CPE*). Em condições otimizadas e utilizando a técnica de voltametria adsorptiva de onda quadrada, o sensor proposto exibiu excelente resposta em uma faixa linear de concentração entre $2,5 \times 10^{-6}$ e $48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de $6,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (com execução em triplicata, $S/\sigma = 3$). O sensor foi submetido a testes de repetibilidade e estudos de interferentes, obtendo resultados satisfatórios. As vantagens obtidas com o método proposto foram alta robustez, inúmeras análises, renovação da superfície do eletrodo por polimento simples, alta sensibilidade, seletividade e baixo custo. Por fim, o sensor foi aplicado em diferentes matrizes (formulações farmacêuticas e amostras de água de rios), apresentando porcentagens de recuperação próximas a 100%.

Palavras-chave: *MIPs* magnéticos (*mag-MIPs*), adsorção, ácido fólico e seus metabólitos, sensor eletroquímico.

ABSTRACT

The present work aimed to develop an analytical method based on biomimetic systems for the selective determination of folic acid. The construction of the biomimetic system was done by means of molecularly imprinted polymers, better known as *MIPs* (Molecularly Imprinted Polymers) synthesized on magnetic nanoparticles (Fe_3O_4) in core-shell format (mag-*MIPs*). The nanoparticles were obtained by the polyol method, which resulted in monodisperse, uniform, hydrophilic, highly crystalline and colloidally stable particles. The mag-*MIPS* and the control polymers or mag-NIPs (Molecularly Non-Imprinted Polymers) were morphologically characterized (SEM, FTIR and BET analyses) and subjected to rebinding tests with solutions of different folic acid concentrations in order to check their analytical performance. After proving the higher efficiency of mag-*MIPS*, these materials were used as modifiers in carbon paste electrodes combined with graphene oxide (mag-*MIP*-GO/CPE sensor). Under optimized conditions and using square wave adsorptive voltammetry, the proposed sensor exhibited excellent response over a linear concentration range between 2.5×10^{-6} and 48×10^{-6} mol L^{-1} and a detection limit of 6.5×10^{-7} mol L^{-1} (triplicate run, $S/\sigma = 3$). The sensor was subjected to repeatability tests and interference studies, obtaining satisfactory results. The advantages obtained with the proposed method were high robustness, numerous analyses, renewal of the electrode surface by simple polishing, high sensitivity, selectivity, and low cost. Finally, the sensor was applied in different matrices (pharmaceutical formulations and river water samples), presenting recovery percentages close to 100%.

Keywords: magnetic *MIPs* (mag-*MIPs*), adsorption, folic acid and its metabolites, electrochemical sensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo do sistema eletroquímico utilizado	13
Figura 2. Alimentos ricos naturalmente em vitamina B9.....	14
Figura 3. Esquema da obtenção do óxido de grafeno a partir do grafite.....	17
Figura 4. Esquema geral do preparo de <i>MIPs</i>	18
Figura 5. Esquema do potenciostato Autolab® e o software Nova 2.0.	21
Figura 6. Esquema ilustrativo do sistema eletroquímico utilizado	24
Figura 7. Imagens MEV de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ (A-B) e a distribuição de diâmetro das nanopartículas (C). Imagens MEV de <i>mag-MIP</i> (D-F) e <i>mag-NIP</i> (G-I).....	27
Figura 8. Espectros na região infravermelha de <i>mag-MIP</i> , <i>mag-NIP</i> e o monômero estrutural (EDGMA).....	28
Figura 9. Espectros na região infravermelha de ácido fólico e os polímeros (<i>mag-MIP</i> , <i>mag-NIP</i>) após a adsorção do analito nos testes de ligação	28
Figura 10. Curva analítica obtida por HPLC-UV para a determinação da concentração de ácido fólico (AF).	29
Figura 11. Isotermas de ligação para a adsorção de diferentes concentrações de AF por <i>mag-MIPs</i> e <i>mag-NIPs</i>	30
Figura 12. Isoterma de adsorção de Langmuir para <i>mag-MIP</i> com diferentes concentrações de ácido fólico (2 a 12 mg L ⁻¹). O tempo de ligação foi de 120 min.....	31
Figura 13. Perfil eletroquímico dado por VOQ para os eletrodos (CPE, GO / CPE, <i>mag-NIP</i> /GO/CPE e <i>mag-MIP</i> /GO/CPE) na presença de ácido fólico (4,0 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) e solução tampão de fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). Condições de VOQ: f = 10 Hz, a = 50 mV, ΔEs = 5 mV.	32
Figura 14. Efeito do pH nas medições do sensor <i>mag-MIP</i> /GO/CPE utilizando solução de ácido fólico de 2,0×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,0). Condições (VOQ) : f = 10 Hz, a = 50 mV, ΔEs = 5 mV.....	33
Figura 15. Determinação eletroquímica de ácido fólico por VOQ usando o sensor <i>mag-MIP</i> /GO/CPE em solução tampão de fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) com sua curva analítica correspondente inserida. Condições VOQ: f = 10 Hz, a = 50 mV, ΔEs = 5 mV.	34
Figura 16. Estudo de repetibilidade usando o sensor modificado <i>mag-MIP</i> /GO/CPE	35
Figura 17. Estudo de interferentes usando o sensor modificado <i>mag-MIP</i> /GO/CPE ..	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudo de área superficial e volume de poro do <i>mag-MIP</i> e <i>mag-NIP</i> obtidos pelo método BET.....	27
Tabela 2. Concentração de ácido fólico obtida a partir do sinal eletroquímico da amostra real diluída do complexo vitamínico Fosfolin®.....	36
Tabela 3. Resultados obtidos na aplicação do sensor em amostras de água de rio enriquecidas com ácido fólico (duas concentrações). Comparação com o método cromatográfico (HPLC-UV).....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Ácido Fólico	14
2.1.1	<i>Aplicações industriais</i>	<i>15</i>
2.1.2	<i>Métodos de Determinação do Ácido Fólico</i>	<i>15</i>
2.2	Sensores Eletroquímicos.....	15
2.2.1	<i>Óxido de grafeno.....</i>	<i>17</i>
2.3	Polímeros Magnéticos Molecularmente Impressos (MIPs).....	17
3	OBJETIVO	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	Reagentes e Soluções.....	21
4.2	Medidas Eletroquímicas	21
4.3	Medidas cromatográficas (HPLC-UV)	22
4.4	Síntese das nanopartículas magnéticas recobertas com MIP	22
4.5	Experimentos de adsorção (testes de ligação)	23
4.6	Preparo do sensor eletroquímico modificado	23
4.7	Experimentos eletroquímicos	24
4.8	Estudo de seletividade	24
4.9	Aplicação do sensor (<i>mag-MIP-GO/CPE</i>) em amostras de suplemento vitamínico.....	25
4.10	Aplicação do sensor (<i>mag-MIP-GO/CPE</i>) em amostras de águas de rios.....	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	Caracterização química e morfológica dos materiais sintetizados	26
5.2	Testes de ligação e estudo de seletividade.....	29

5.3	Perfil eletroquímico dos eletrodos por voltametria de onda quadrada (VOQ)	31
5.4	Efeito do pH.....	32
5.5	Determinação eletroquímica de ácido fólico via VOQ.....	33
5.6	Estudo de seletividade e repetibilidade.....	34
5.7	Aplicação do sensor em amostras de suplemento vitamínico.....	36
5.8	Aplicação do sensor em amostras de água de rios	36
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de polímeros molecularmente impressos ou *MIPs* (do inglês, *molecularly imprinted polymers*), é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da Química Analítica. Este avanço se deve à procura por materiais compatíveis à análise sensível, seletiva, estável e de baixo custo de amostras cada vez mais complexas, sejam elas: alimetícias, farmacológicas, clínicas ou ambientais. Tais polímeros possuem a capacidade de selecionar moléculas específicas (analitos-alvo) graças à presença de sítios (ou cavidades) de identificação, estereoquimicamente moldados a partir de uma molécula-molde (*template*), sendo esta, na maioria dos casos, o próprio analito. Na literatura, ainda têm sido descritos diferentes métodos de síntese de *MIPs* de modo a aumentar a sua eficiência e melhorar o reconhecimento biomimético dos analitos-alvo [1-3]. Entre eles, destaca-se a associação desses polímeros a nanopartículas magnéticas por meio da configuração *core-shell* (polimerização do *MIP* recobrindo a nanopartícula magnética) [4].

Neste contexto, o desenvolvimento de *MIPs* magnéticos (*mag-MIPs*) também se mostra como uma alternativa promissora para detecção sensível e seletiva da substância foco do presente trabalho: o ácido fólico. A deficiência desse composto no organismo pode estar ligada a potenciais riscos para saúde, sendo ele, portanto, amplamente sintetizado para aplicações industriais (em suplementos e alimentos industrializados) [5,6].

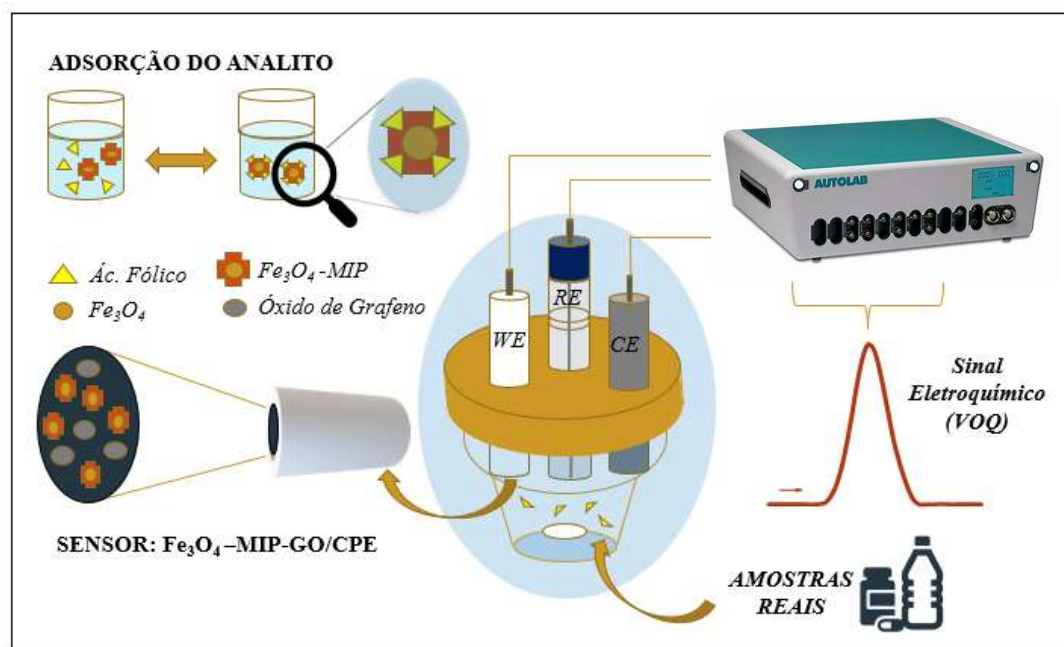
Ainda, como a utilização de métodos eletroanalíticos na detecção e quantificação de substâncias oferece grande sensibilidade e simplicidade, a modificação da superfície de sensores eletroquímicos com os *mag-MIPs* se apresenta como forma de melhorar o desempenho analítico destes eletrodos, impondo e controlando a sua reatividade e/ou seletividade. Dessa forma, torna-se possível o desenvolvimento de eletrodos com diferentes plataformas eletroquímicas visando a diferentes propósitos e aplicações [7,8]. Além disso, pode-se fazer uso de outros modificadores associados aos *mag-MIPs*, como o óxido de grafeno (*GO*), que é um material de carbono muito utilizado no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. O propósito do uso do *GO* é devido a ótima condutividade desse material, permitindo que um efeito sinérgico seja obtido na combinação com outros materiais [9].

Dessa forma, este projeto visa à utilização dos polímeros magnéticos molecularmente impressos (*mag-MIPs*) para detecção sensível e seletiva do ácido fólico

em eletrodos quimicamente modificados (EQMs). Para isso, foi escolhido o método da imobilização por oclusão em compósito (partículas de *mag-MIP* misturadas em pasta de carbono), como mostrado no esquema da **Figura 1**.

Os estudos apresentados neste trabalho incluem: a caracterização morfológica e química dos polímeros sintetizados; estudos de isotermas de adsorção; a otimização dos sensores eletroquímicos modificando-os com óxido de grafeno e com os *mag-MIPs*; estudos de repetibilidade, seletividade e influência de interferentes na análise do sensor e, por fim, a aplicação do sensor modificado na detecção de ácido fólico em amostras reais.

Figura 1. Esquema ilustrativo do sistema eletroquímico utilizado.



Fonte: Adaptado de GARCIA et al, 2021.^[33]

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido Fólico

A vitamina B9, pertencente a classe do complexo B, pode ser encontrada naturalmente como folato em alimentos (**Figura 2**), tais como vegetais de cor verde-escura (espinafre e mostarda) e frutas (especialmente a laranja). Já na sua forma química sintetizada, denominada ácido fólico, essa substância é utilizada para fins comerciais na composição de suplementos, medicamentos e na fortificação de alimentos industrializados [5].

Figura 2. Alimentos ricos naturalmente em vitamina B9.



Fonte: Adaptado de FDA, 2021.^[10]

Essa substância desempenha diversas funções no organismo humano, com destaque à sua participação em reações metabólicas e de sínteses biológicas (formação de DNA e RNA) [5]. Sua carência pode acarretar potenciais riscos como o desenvolvimento de câncer, anemia megaloblástica, doença cardiovascular, doença de Alzheimer e transtornos psiquiátricos [6]. Ainda nesse cenário, destaca-se a importância de uma ingestão adequada de ácido fólico ou folato durante a gravidez para a redução de problemas graves ao bebê como, por exemplo, a anencefalia e espinha bífida, sendo recomendado para gestantes – segundo a FDA – uma dose diária de 400 mcg de ácido fólico adicionais à dieta alimentar das gestantes [10].

2.1.1 *Aplicações industriais*

Os segmentos de aplicação do ácido fólico incluem bebidas alimentícias, farmacêuticos, nutracêuticos, entre outros. Ele é amplamente utilizado na terapia nutricional para tratar distúrbios do sistema nervoso, urinário e cardiovascular no setor farmacêutico. Na indústria nutracêutica, este produto é utilizado na produção de suplementos vitamínicos. Ainda, possui vasta aplicação em produtos de cuidados com a pele no setor de cosméticos. No setor alimentício, é adicionado, em muitos países de maneira mandatória, a uma variedade de produtos, como: farinhas, cereais, sais, refrigerantes, sucos, entre outros alimentos enriquecidos [11].

2.1.2 *Métodos de Determinação do Ácido Fólico*

Devido à relevância anteriormente mencionada, a detecção e quantificação do ácido fólico e seus metabólitos em amostras é altamente desejável. Uma série de procedimentos analíticos são atualmente utilizados e documentados em diferentes trabalhos. Entre os métodos de detecção e quantificação, destacam-se: a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, “*High-Performance Liquid Chromatography*”), a análise espectrofotométrica na região ultravioleta (UV), luminescência de injeção de fluxo, e o uso de sensores eletroquímicos [12-15].

Ainda que esses métodos sejam reconhecidamente bem sucedidos na detecção e determinação do ácido fólico, alguns, frequentemente, envolvem: procedimentos laboriosos (como a pré-concentração), a necessidade do uso de grandes volumes de solventes (muitas vezes tóxicos), instrumentos de alto custo e, até mesmo, um tempo relativamente longo de análise. Dessa forma, na busca por métodos mais rápidos, seletivos e sensíveis, os sensores eletroquímicos têm atraído maior atenção por oferecerem simultaneamente precisão, baixo custo e simplicidade [15,16].

2.2 **Sensores Eletroquímicos**

Sensores eletroquímicos são dispositivos que podem fornecer informações sobre o ambiente no qual estão inseridos com uma mínima manipulação do sistema. As principais características desses dispositivos são: precisão, sensibilidade, estabilidade e possibilidade de operação em diferentes matrizes. Ainda, podem ser facilmente automatizados ou se apresentar em versões portáteis e miniaturizadas [17].

Quanto à transdução do sinal, os sensores podem ser classificados em potenciométricos, amperométricos e condutométricos. Nos potenciométricos, o equilíbrio é atingido na interface do sensor e as informações analíticas são adquiridas por meio da diferença de potencial entre dois eletrodos, a qual é proporcional à atividade das espécies envolvidas. Já os sensores amperométricos utilizam, como informação analítica, a corrente gerada em resposta ao comportamento redox do analito na superfície do eletrodo, isto é, registram o fluxo da corrente na célula eletroquímica em um determinado potencial. A característica operacional desses dispositivos é a transferência de elétrons para o analito. Por fim, os sensores condutométricos são baseados na mudança de condutividade causada pelo analito. Para obter informações de mudanças na concentração de espécies de íons, a medição de condutância ou resistência elétrica são os parâmetros básicos [17,18].

No entanto, apesar da alta flexibilidade, algumas limitações podem levar a um desempenho analítico insatisfatório dos sensores eletroquímicos. Por exemplo, a passivação da superfície do eletrodo, uma corrente de fundo elevada e, principalmente a falta de seletividade – uma vez que mais de uma espécie química pode ser eletroativa em um mesmo potencial selecionado [17,18].

Uma maneira de superar tais limitações é o uso de eletrodos quimicamente modificados (EQM), originalmente definidos por Murray em 1975. Esses dispositivos são formados pela imobilização de espécies químicas condutoras ou semicondutoras na superfície do eletrodo, modificando suas propriedades químicas, eletroquímicas, ópticas, de transporte de massa ou elétricas. Por meio dos modificadores utilizados nos EQMs, torna-se possível o aumento da área eletroativa da superfície do eletrodo, uma vez que esses materiais apresentam estruturas tridimensionais. Dessa forma, as espécies de interesse tem sua reação catalisado, promovendo melhorias na resposta analítica [18,19].

Quanto aos elementos modificadores, os mais usuais são materiais nanoestruturados, tais como: nanopartículas de metais nobres ou de óxidos metálicos, nanofios metálicos, grafeno, óxido de grafeno e nanotubos de carbono [20-22].

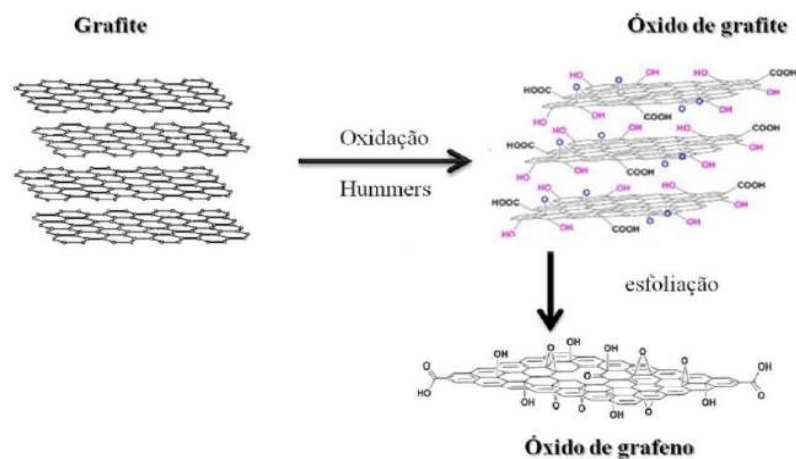
Ainda, a utilização dos polímeros molecularmente impressos (*MIPs*) para a obtenção de EQMs na construção de sensores eletroquímicos, se mostra como uma opção bastante efetiva e atraente no se refere ao ganho considerável de seletividade em matrizes complexas [18].

2.2.1 Óxido de grafeno

De acordo com a literatura, o óxido de grafeno (*GO*), facilmente dispersável em água, é compatível como material de suporte no desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos, pois permite o aumento da taxa de transferência de elétrons, contribuindo para o aumento da sensibilidade do sensor. Isso pode ser explicado pelos grupos funcionais ajustáveis do *GO* (grupos hidroxila, carboxila e epóxi), sua alta área de superfície, suas excelentes propriedades condutivas e mecânicas e sua alta compatibilidade com polímeros [22,23].

Em um dos procedimentos mais comuns para a formação do *GO* (**Figura 3**), o grafite (lâminas de grafeno) é submetido à oxidação química, a qual introduz grupos oxigenados de forma intercalada entre as folhas de carbono, mudando sua hibridização de sp^2 para sp^3 , e, portanto, aumentando a distância interplanar [24]. A presença de tais grupos confere ao *GO* vantagens em relação a outros modificadores (como o grafeno, por exemplo) no que se refere a funcionalização do material. Como exemplo de funcionalização, tem-se os grupos epóxidos susceptíveis a ataques de substituição por $-NH_2$, tornando interessante a imobilização de polímeros, biomoléculas e moléculas orgânicas [17].

Figura 3. Esquema da obtenção do óxido de grafeno a partir do grafite



Fonte: BELUOMINI, 2018.^[17]

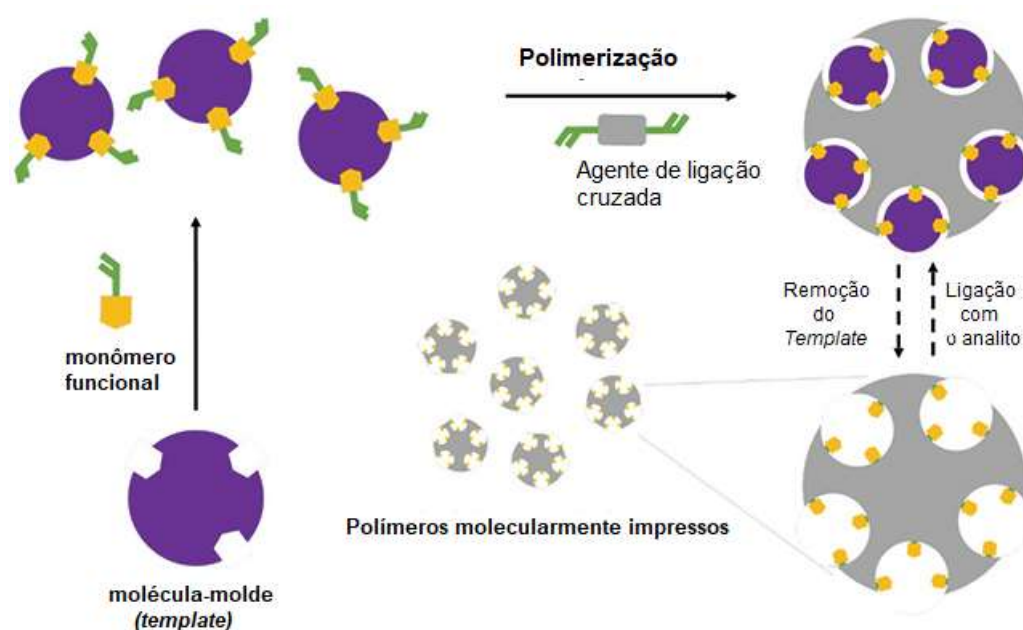
2.3 Polímeros Magnéticos Molecularmente Impressos (MIPs)

A técnica de impressão molecular vem se tornando cada vez mais promissora no preparo de sensores eletroquímicos feitos sob medida, com elevada seletividade, confiabilidade e estabilidades mecânicas, térmicas e químicas [25,26].

Os polímeros molecularmente impressos (no inglês, *molecularly imprinted polymers – MIPs*) possuem a capacidade de selecionar uma molécula específica graças à presença de sítios (cavidades) de identificação estereoquimicamente moldados a partir de uma molécula-alvo simulando, dessa forma, um sistema enzima/substrato ou antígeno/anticorpo [1]. No entanto, os *MIPs* apresentam diversas vantagens quando comparados aos sistemas biológicos, como baixo custo, fácil preparo e compatibilidade a ambientes mais hostis para materiais biológicos (presença de ácidos, bases, diferentes temperaturas e pressões) [1-3].

Quanto ao processo de síntese mostrado na **Figura 4**, os *MIPs* são formados pelo crescimento de um polímero em torno de uma molécula-molde (*template*), isto é, o analito em questão. O processo se inicia na mistura do analito e do monômero que contém grupos funcionais complementares aos do *template*, formando o complexo “monômero-molde”. Posteriormente, são introduzidos no meio reacional o reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar de polimerização, a qual se inicia pelo aquecimento ou pela exposição à radiação UV [27-29]. Deve-se ressaltar que, normalmente, utiliza-se o fluxo de nitrogênio (N_2) no meio reacional afim de proporcionar um meio livre de oxigênio (O_2), uma vez que o último retarda a reação de polimerização [28,29]. Após a formação do polímero, a molécula usada como molde é separada do *MIP* por lavagem com solvente apropriado e as cavidades complementares à molécula-alvo são formadas [27-29].

Figura 4. Esquema geral do preparo de *MIPs*



Fonte: Adaptado de BAHRANI et al., 2021.^[27]

Uma vasta gama de nanopartículas magnéticas tem sido aplicadas como material base (*core*) na síntese de *MIPs* magnéticos (*mag-MIPs*), dentre eles os mais usados consistem em óxidos de ferros, como magnetita (Fe_3O_4) e magmita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), devido a propriedades como super-paramagnetismo, alta estabilidade e biocompatibilidade [30].

A principal vantagem do uso da magnetita consiste em sua característica superficial adequada à modificação e ao encapsulamento de partículas, o que simultaneamente promove a proteção à degradação e a manutenção da resposta magnética. As nanopartículas de magnetitas podem ser obtidas, principalmente, por meio de duas técnicas: a co-precipitação e o método do poliol [30].

Na co-precipitação, FeCl_3 e FeCl_2 são usados para a precipitação de magnetita em meio alcalino e, o material é posteriormente modificado em outras duas etapas: silanização e funcionalização. Já o método do poliol permite a síntese da magnetita por uma rota alternativa, empregando o acetilacetato de ferro (III) como sal precursor e decompondo-o em um poliol (trietileno glicol, TEG). Tal técnica permite a obtenção, em uma etapa, de nanopartículas de magnetita ainda menores, monodispersas, uniformes, hidrofílicas, altamente cristalinas, coloidalmente estáveis e de maior caráter magnético [31].

Na síntese dos *mag-MIPs*, a polimerização do *MIP* ocorre sobre as partículas magnéticas (*core-shell*), permitindo uma maior exposição dos sítios ou cavidades de reconhecimento do analito. Esse aumento pode elevar a capacidade de impressão do *MIP* em até 15 vezes e, portanto, tornar a adsorção específica mais efetiva em experimentos de religação (*MIP*-analito) quando comparada ao polímero de controle – *NIP*, do inglês, *non-molecularly imprinted Polymer* – sintetizado sem a presença do analito [4].

Nesse cenário, os *mag-MIPs* ainda se sobressaem aos *MIPs* convencionais pela possibilidade de aplicação diretas nas amostras (sem necessidade de pré-tratamento) e pela facilidade na separação do polímero e da solução de análise por meio da aplicação de um campo magnético (ímãs de neodímio, por exemplo) [30].

Por fim, voltando à aplicação de tais polímeros em EQMs, a modificação da superfície de um sensor eletroquímico por *mag-MIPs*, apresenta, além de praticidade, uma forma de impor e controlar a reatividade e/ou seletividade do sensor, possibilitando o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações [7,8].

3 OBJETIVO

O objetivo geral do projeto consiste na síntese de polímeros magnéticos molecularmente impressos (*mag-MIPs*) como modificadores em sensores eletroquímicos personalizados à detecção sensível e seletiva de ácido fólico. Já os objetivos específicos consistem em:

- I. Estudar a otimização dos parâmetros relacionados à síntese do *mag-MIP* seletivo ao ácido fólico (quantidade de reagentes e método utilizado em cada procedimento). Realizar a síntese dos *mag-MIPs* conjuntamente ao seu polímero de controle (*mag-NIPs*);
- II. Caracterizar morfológica e quimicamente os materiais sintetizados (magnetita, *mag-MIPs*, *mag-NIPs*) por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), do método de Bunauer-Emmett-Teller (BET) e da espectroscopia de infravermelho (*fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR);
- III. Realizar experimentos de religação com os polímeros sintetizados na presença de soluções de diferentes concentrações de ácido fólico. Analisar a quantidade de analito adsorvida pelo método cromatográfico (*HPLC-UV*). Avaliar a eficiência dos *mag-MIPs* por meio da elaboração de isotermas de adsorção;
- IV. Preparar os sensores eletroquímicos (eletrodo de pasta de carbono, *CPE*) modificados com óxido de grafeno e *mag-MIPs*. Otimizar parâmetros experimentais das técnicas voltamétricas (voltametria de onda quadrada) para melhor resposta analítica;
- V. Realizar o estudo dos possíveis interferentes, bem como verificar a estabilidade e repetibilidade das medidas;
- VI. Aplicar o sensor desenvolvido na determinação de ácido fólico em amostras reais. Validar o método analítico desenvolvido por meio de ensaios de recuperação.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes e Soluções

Todas as soluções empregadas foram preparadas com água deionizada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Direct-0,3). Os seguintes reagentes foram empregados na síntese das nanopartículas magnéticas: acetato de etila, trietileno glicol (TEG, 99%), etanol e acetilacetato de ferro (III). Ainda, para a síntese do *mag-MIPs* e *mag-NIPs* fez-se uso de: ácido fólico como *template*, ácido metacrílico como monômero funcional, etilenodimetacrilato (EDMA) como reagente de reação cruzada e 2,2-azo-bisisobutironitrila (AIBN) como iniciador radicalar. Todos os reagentes supracitados foram obtidos pela empresa Sigma-Aldrich.

4.2 Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram obtidas usando o potenciostato da Autolab® acoplado a uma célula eletroquímica convencional de 3 eletrodos, contendo um eletrodo de referência de $\text{Ag}|\text{AgCl}(\text{KCl}_{\text{sat}})$ comercial (Analion®), um fio de platina em forma de espiral como eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho, pasta de carbono modificada com óxido de grafeno e com os *mag-MIPs* e *mag-NIPs* sintetizados (*mag-MIP-GO/CPE*). Conforme a **Figura 5**, os resultados das medidas puderam ser visualizados através do software instalado ao computador (NOVA 2.0), disponibilizado pela própria Autolab®.

Figura 5. Esquema do potenciostato Autolab® e o software Nova 2.0.



Fonte: Metrohm Autolab, 2021.

4.3 Medidas cromatográficas (*HPLC-UV*)

As medidas cromatográficas foram realizadas com o cromatógrafo Shimadzu 20A. O equipamento foi conectado a um microcomputador e era composto de um detector de UV visível (modelo SPD-20A), autoinjeter (modelo SIL-20A) e desgaseificador (modelo DGU-20A5). A fase estacionária utilizada para a análise cromatográfica foi uma coluna C18 de fase reversa (Shim-pack CLC, Shimadzu). A fase móvel foi uma mistura de metanol e tampão fosfato ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), seguindo a relação volumétrica de 60:40 v/v, respectivamente. A vazão volumétrica foi ajustada para $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e o detector operou em um comprimento de onda de 280 nm [32].

4.4 Síntese das nanopartículas magnéticas recobertas com *MIP*

O método do poliol foi escolhido para síntese das nanopartículas magnéticas (magnetita) como alternativa ao método de co-precipitação. Por essa rota de síntese foi obtida partículas monodispersas ainda menores, uniformes, hidrofílicas, altamente cristalinas e coloidalmente estáveis. As nanopartículas de magnetita foram preparadas por decomposição térmica de acetilacetato de ferro (III) em trietilenoglicol (TEG) a 280°C . Para isso, 4,24 g do sal férrico foi dissolvida em 80 mL de TEG em um balão de fundo redondo de três tubulações equipado com um condensador, de modo a obter a concentração molar de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. A mistura foi aquecida a 120°C por 30 min com agitação por fluxo de nitrogênio, em seguida, a temperatura da mistura foi aumentada até 180°C e mantida por 30 min. Por fim, a temperatura foi aumentada até 280°C por um tempo de 60 min, e após esse período a suspensão foi deixada em repouso e resfriada até a temperatura ambiente. Posteriormente, 60 ml de acetato de etila e 10 ml de etanol foram adicionados à dispersão coloidal resultante, a fim de permitir a floculação das nanopartículas [31].

As nanopartículas foram separadas do meio de dispersão por meio da centrifugação e depois por sedimentação assistida por campo magnético usando um ímã de neodímio até o sobrenadante tornar-se incolor. As nanopartículas foram dispersas em água deionizada e secadas em estufa à 50°C .

Os *MIPs* magnéticos (*mag-MIPs*) foram preparados por processo de polimerização na configuração *core-shell*, utilizando os seguintes reagentes: 0,2 mmol de ácido fólico, 0,8 mmol de monômero funcional (ácido metacrílico) em 30 mL de etanol. A mistura foi agitada por 3 h e então 200 mg da nanopartícula de magnetita sintetizada

pelo método do poliálcool foram adicionados ao sistema de reação, o qual foi agitado por mais 3 h. Posteriormente, 4,0 mmol de EDGMA e 0,05 mmol de AIBN foram adicionados ao sistema e a reação foi deixada a 60 °C sob nitrogênio por 12 h [1-4].

Após a polimerização, o *mag-MIP* foi submetido a sucessivas lavagens à frio (por períodos de 20 min) com hidróxido de sódio (0,01 mol L⁻¹). Por fim, fez-se a lavagem com metanol e água deionizada, fazendo uso da filtração à vácuo a cada lavagem. O processo durou 24 h e fez-se o monitoramento das alíquotas utilizando o método cromatográfico (*HPLC-UV*), com o objetivo de verificar a remoção completa do analito. Deve-se ressaltar que os polímeros magnéticos não-molecularmente impressos (*mag-NIPs*) foram preparados sob as mesmas condições descritas acima, no entanto, sem a adição do analito (ácido fólico).

4.5 Experimentos de adsorção (testes de ligação)

Para avaliar o desempenho do *mag-MIP* e *mag-NIP* sintetizados, testes de adsorção foram realizados em condições ideais. Para tanto, 3,0 mg desses compostos foram adicionados em diferentes frascos junto com 1,0 mL de diferentes concentrações de ácido fólico obtido a partir de uma solução estoque (1,0 × 10⁻² mol L⁻¹). A mistura foi agitada durante 2 h usando um homogeneizador mecânico. Após esse período, os polímeros foram separados com uma barra magnética e a solução foi filtrada através de uma membrana de poliéster (tamanho de poro de 0,45 µm, diâmetro de 25 mm, adquirido na Chromafil). A seguir, o sobrenadante filtrado foi separado e analisado por meio do método HPLC-UV.

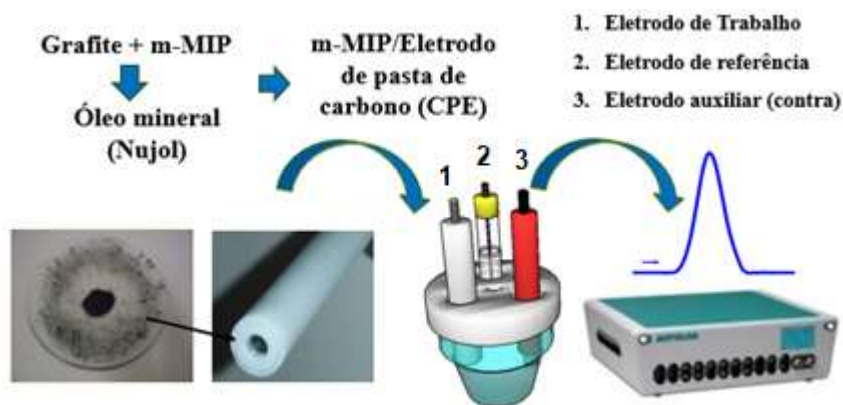
A concentração de ácido fólico adsorvida pelos polímeros foi determinada a partir do cálculo: $C_{\text{adsorvida}} = C_{\text{adicionada}} - C_{\text{encontrada}}$ [32].

4.6 Preparo do sensor eletroquímico modificado

Os eletrodos de pasta de carbono foram confeccionados junto a oficina do Instituto de Química (UNESP), sendo composto de uma haste condutora feita de cobre em contato com um disco de platina revestido com Teflon (diâmetro = 3 cm e comprimento = 5 cm). Sendo composto de uma cavidade que foi utilizada para imobilização da pasta de carbono. Para formação da pasta de carbono modificada, 15 mg de polímero (*mag-MIP* ou *mag-NIP*) e 15 mg de óxido de grafeno (obtido pela Sigma-Aldrich) foram misturados a 70 mg de grafite (pó) utilizando um pistilo e almofariz. Após a completa homogeneização, uma

quantidade suficiente de óleo mineral (Nujol) foi adicionada para obtenção da pasta de carbono modificada. A **Figura 6** mostra um esquema ilustrativo do sistema eletroquímico utilizado.

Figura 6. Esquema ilustrativo do sistema eletroquímico utilizado



Fonte: Adaptado de Wong et al, 2016.^[23]

4.7 Experimentos eletroquímicos

A detecção e quantificação do ácido fólico foram realizadas pela técnica de voltametria de onda quadrada (SWV). As condições de análise ideais foram: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) como eletrólito, frequência (f) = 10 Hz, amplitude (a) = 50 mV, incremento de potencial (ΔE_s) = 5 mV, potencial de acumulação (E_{acc}) = 0 V e tempo de acumulação (t_{acc}) = 60 s. A varredura de potencial ocorreu de 0 a 1 V, uma vez que o pico do potencial (E_p) mostrado para análise de ácido fólico foi de 0,75 V vs. Ag / AgCl (KCl_{sat}).

4.8 Estudo de seletividade

A seletividade do método foi estudada utilizando cinco compostos químicos amplamente consumidos e/ou eliminados diariamente pela população (paracetamol, dipirona, ácido úrico, ácido ascórbico e ureia), além do ácido fólico por voltametria de onda quadrada (SWV) na razão de concentração (1:1). As soluções foram preparadas com água deionizada na concentração de $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

4.9 Aplicação do sensor (*mag-MIP-GO/CPE*) em amostras de suplemento vitamínico

Ainda, fez-se a aplicação do sensor biomimético em uma amostra real do suplemento vitamínico Fosfolin®, rico em ácido fólico (5 mg de AF/comprimido). Dez comprimidos foram pesados e macerados, e, posteriormente, preparou-se uma solução com 5 mg da amostra homogeneizada em um balão de 10 mL. As medidas eletroquímicas foram realizadas adicionando-se uma alíquota da solução preparada à cela eletroquímica.

4.10 Aplicação do sensor (*mag-MIP-GO/CPE*) em amostras de rio

Amostras de água foram coletadas em dois rios diferentes no município de Araraquara, SP em três diferentes posições e profundidades. As amostras foram misturadas e submetidas à filtração convencional para retirada do material sólido, sendo posteriormente armazenadas em geladeira. Na etapa de preparação da amostra, as soluções foram preparadas adicionando ácido fólico às amostras de água do rio em dois níveis de concentração (10×10^{-6} e 30×10^{-6} mol L⁻¹). Depois de preparadas, as amostras foram analisadas por métodos eletroquímicos e HPLC-UV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades propostas na *Seção 4* são mostradas a seguir. Elas incluem: estudos de isotermas de adsorção, caracterização morfológica e química dos polímeros sintetizados, a otimização dos sensores eletroquímicos modificando-os com grafeno e os *mag-MIPs* otimizados, a realização de outros testes de repetibilidade, estudos de seletividade e influência de interferentes e por fim, a aplicação do sensor modificado com *mag-MIP* para detecção de ácido fólico em amostras reais. Parte dos resultados obtidos neste trabalho também pode ser contemplada no artigo publicado pela revista *Talanta* em 2021: “*A simple, sensitive and efficient electrochemical platform based on carbon paste electrode modified with Fe₃O₄@MIP and graphene oxide for folic acid determination in different matrices*”, produzido pela autora do presente documento (Sara Manente Garcia), em conjunto com seus supervisores e colaboradores: Dr. Ademar Wong, Dr. Sabir Khan e Profa. Dra. Maria del Pilar Taboada Sotomayor [33].

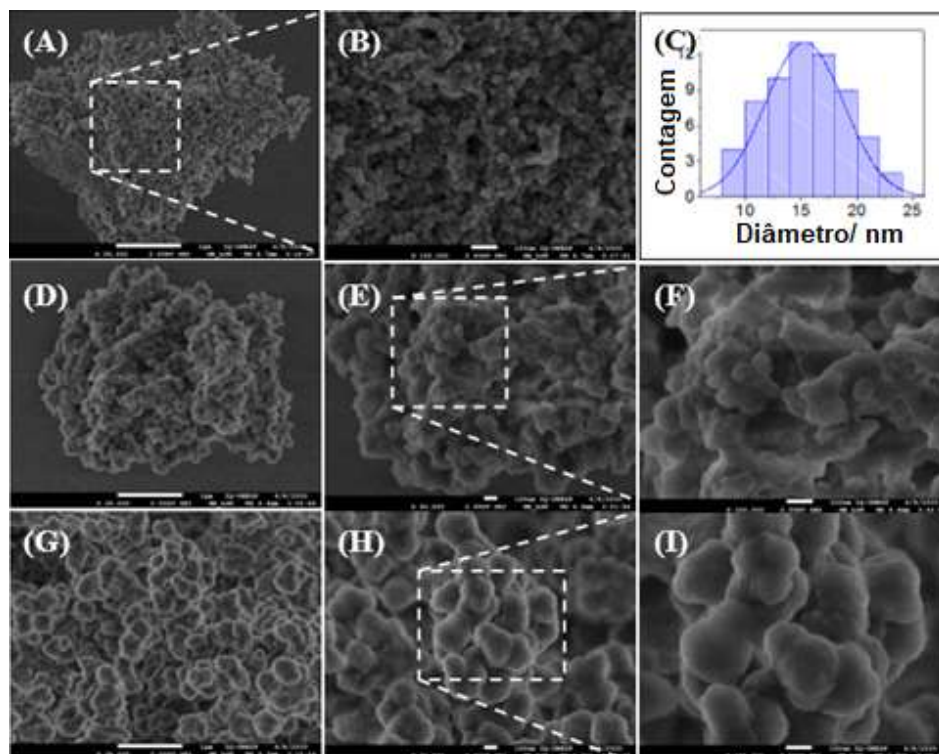
5.1 Caracterização química e morfológica dos materiais sintetizados

Os aspectos morfológicos dos materiais sintetizados (*mag-MIP*, *mag-NIP* e magnetita) foram primeiramente examinados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As nanopartículas metálicas (Fe₃O₄), são mostradas nas Figuras 7A-B, mostram uma distribuição de aglomerados (na forma de esferas) com tamanho médio de 15 nm. Já as Figuras 7D-F mostram a polimerização do *MIP* sobre as nanopartículas de magnetita (*mag-MIP*). Observa-se pelas imagens que há considerável diferença no aspecto morfológico do *mag-MIP* e *mag-NIP*. A imagem do *mag-MIP* tem formato mais esférico e de tamanho uniforme, desempenhando o papel de substrato de suporte bem definido para os materiais impressos nanoestruturados. O diâmetro da superfície (90-150 nm) de *mag-MIP* fornece melhor acessibilidade ao local; resistência de transferência de massa mais baixa e forma de material bem definida para reconhecimento especial em relação ao analito [34,35]. Quanto à polimerização do *NIP* sobre a magnetita (*mag-NIP*), mostrada nas Figuras 7G-I, o tamanho das nanopartículas também sofre aumento (140-180 nm).

Os valores de área superficial e volume de poro obtidos pelo *método BET* para o *mag-MIP* e *mag-NIP*, são mostrados na **Tabela 1**. Os resultados mostram que a área de superfície específica, a área de superfície de microporos e o volume dos poros do *mag-MIP* eram muito maiores do que *mag-NIP*, o que pode ser explicado pela formação de

cavidades seletivas complementares devido à presença de ácido fólico (molécula-molde) durante a síntese do polímero.

Figura 7. Imagens MEV de nanopartículas de Fe_3O_4 (A-B) e a distribuição de diâmetro das nanopartículas (C). Imagens MEV de *mag-MIP* (D-F) e *mag-NIP* (G-I).



Fonte: A autora, 2021.

Tabela 1. Estudo de área superficial e volume de poro do *mag-MIP* e *mag-NIP* obtidos pelo método BET

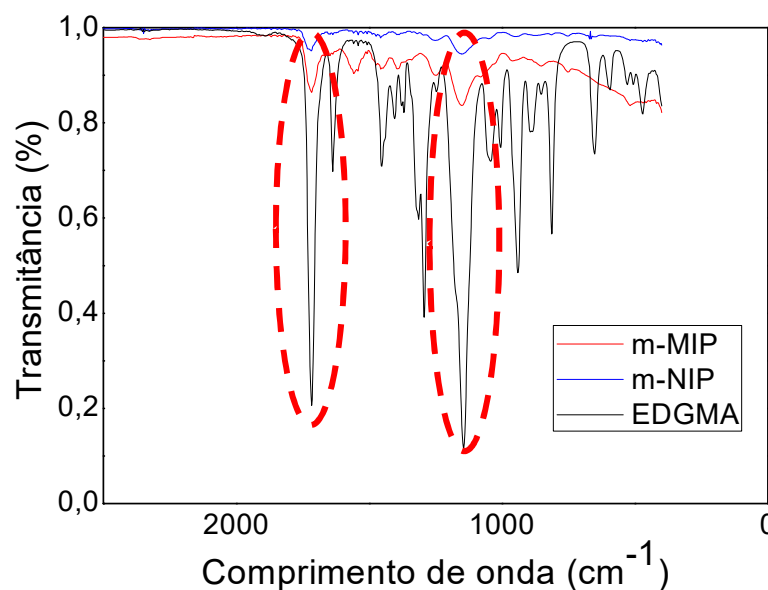
Polímero	Área de Superfície (m^2/g)	Volume do poro (cm^3/g)	Área de superfície de microporos (m^2/g)
<i>mag-MIP</i>	44,2	0,104	1,2
<i>mag-NIP</i>	6,2	0,021	0,1

Fonte: A autora, 2021.

Os polímeros sintetizados também foram analisados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), permitindo a caracterização dos polímeros e dos reagentes utilizados na síntese. A **Figura 8** mostra a comparação do espectro infravermelho obtido para os polímeros impressos e não impressos juntamente com o monômero estrutural EDGMA. Verifica-se que ambos os polímeros são compostos por monômero estrutural por apresentarem bandas características do grupo éster em torno de 1700 cm^{-1} , para o trecho carbonila ($\text{C}=\text{O}$), e em torno de 1150 cm^{-1} , para o trecho C-

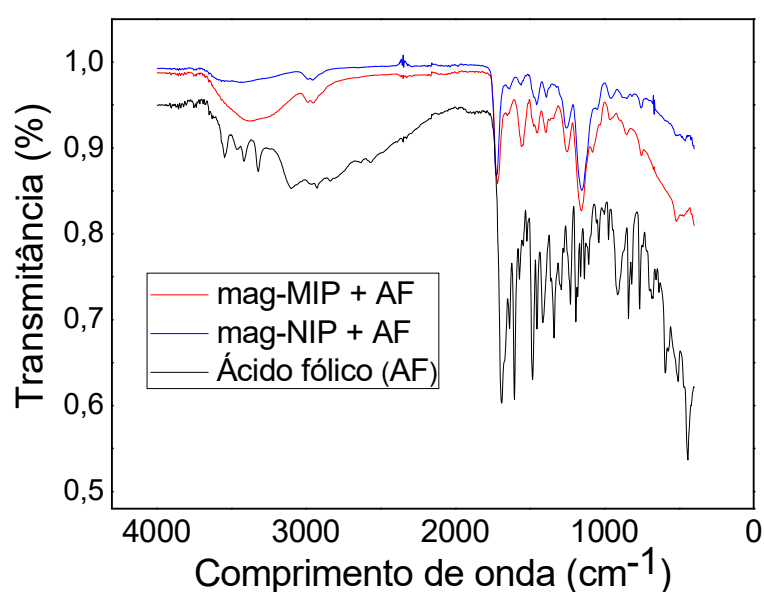
O. Além disso, a intensidade do sinal em torno de 1630 cm^{-1} refere-se à ligação dupla ($C=C$), sugerindo que um processo de polimerização ocorreu através deste grupo funcional e este declínio considerável, deve-se à dupla ligação ser rompida pelo iniciador radicalar a fim de realizar a polimerização. Ainda, ambos os polímeros apresentaram pequenas bandas localizadas em torno de 500 cm^{-1} , correspondendo à banda de absorção de Fe-O característica do Fe_3O_4 .

Figura 8. Espectros na região infravermelha de *mag-MIP*, *mag-NIP* e o monômero estrutural (EDGMA).



Fonte: A autora, 2021.

Figura 9. Espectros na região infravermelha de ácido fólico e os polímeros (*mag-MIP*, *mag-NIP*) após a adsorção do analito nos testes de ligação.



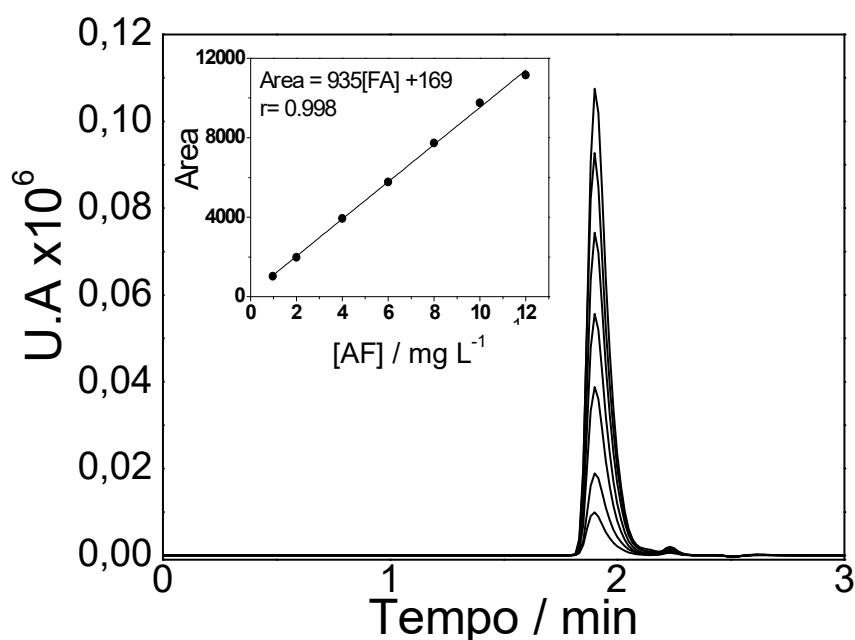
Fonte: A autora, 2021.

Por fim, na **Figura 9** é mostrado o espectro infravermelho obtido para os materiais após um teste de ligação com uma solução de ácido fólico. O polímero impresso (*mag-MIP*) apresentou bandas um pouco mais intensas do que o *mag-NIP* ao se comparar com espectro do analito, o que confirma sua maior seletividade. Isso pode ser especialmente observado entre $2855\text{--}3687\text{ cm}^{-1}$, $1226\text{--}1743\text{ cm}^{-1}$ e cerca de 1170 cm^{-1} .

5.2 Testes de ligação e estudo de seletividade

Estudos de ligação foram realizados, conforme descrito na *Seção 4.5*, para verificar a adsorção de ácido fólico (AF) pelos *mag-MIPs* e *mag-NIPs* sintetizados. Para calcular a concentração restante de AF e, portanto, sua concentração adsorvida pelos polímeros após os testes de ligação; uma curva de calibração foi construída por meio da análise cromatográfica (HPLC-UV). A curva analítica (**Figura 10**) mostra que o aumento na área do sinal detectado no cromatógrafo foi proporcional ao aumento da concentração de analito, proporcionando uma faixa de concentração linear de $2,3 \times 10^{-6}$ a $2,7 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$.

Figura 10. Curva analítica obtida por HPLC-UV para a determinação da concentração de ácido fólico (AF).



Fonte: A autora, 2021.

A capacidade de ligação fornecido pelos *mag-MIPs* e *mag-NIPs* foi calculada usando Eqs. (1) e (2),

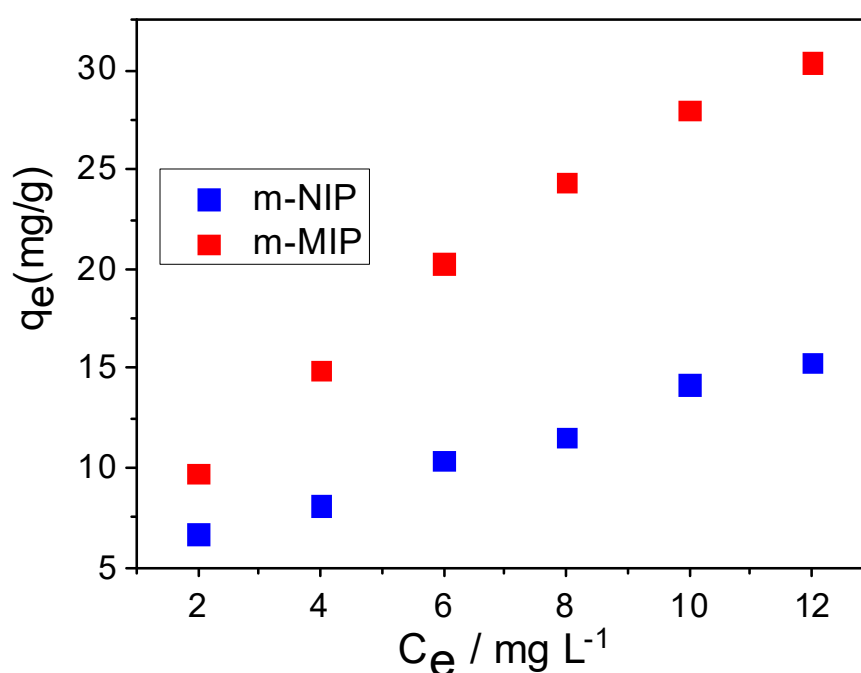
$$Q_t = \frac{(C_o - C_e) \cdot V}{m} \quad (1)$$

$$Q_e = \frac{(C_t - C_e) \cdot V}{m} \quad (2)$$

em que Q_t (mg g^{-1}) representa a quantidade de adsorção experimental no tempo t (2h), Q_e (mg g^{-1}) a quantidade de adsorção de equilíbrio, C_o (mg L^{-1}) a concentração de AF antes da ligação, C_e (mg L^{-1}) a concentração de equilíbrio, C_t a concentração final de AF (mg L^{-1}), V (mL) o volume da solução de AF e m (g) a massa de *mag-MIPs* e *mag-NIPs* dentro de cada frasco [32,36]. Os experimentos foram executados em triplicata.

Os resultados obtidos para a adsorção de AF por cada polímero são apresentados na **Figura 11**. Observa-se que devido à grande disponibilidade de sítios na superfície dos polímeros, um aumento na adsorção de AF foi proporcional à concentração de AF até que os sítios fiquem saturados com as moléculas de AF e o equilíbrio de adsorção são alcançados. A **Figura 11** também evidencia que a capacidade adsorptiva de *mag-MIPs* foi muito maior do que a fornecida pelo polímero de controle (quantidade máxima de ligação de 30,4 mg / g para *mag-MIP* e 15,3 mg / g para *mag-NIP*). Esta diferença pode ser atribuída aos sítios impressos do *mag-MIP* moldados às moléculas de AF, verificando sua especificidade, capacidade de ligação e seletividade para o analito alvo.

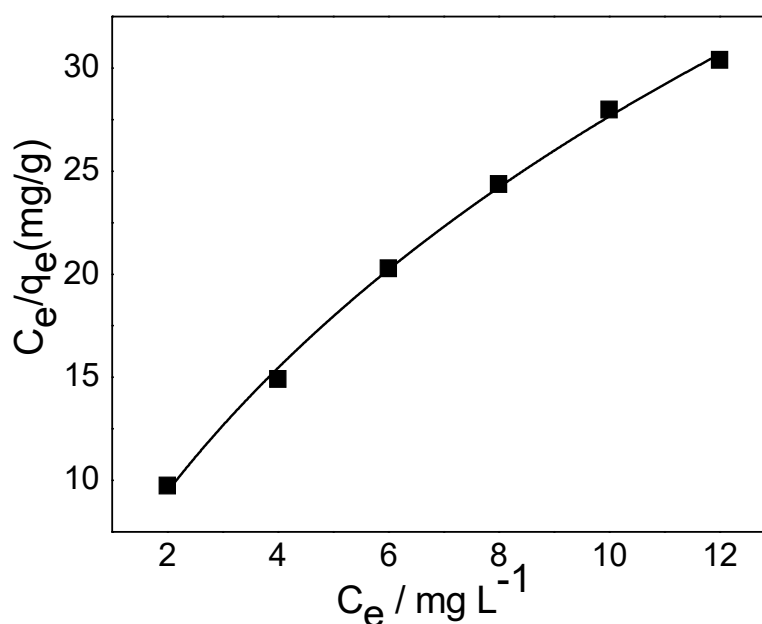
Figura 11. Isotermas de ligação para a adsorção de diferentes concentrações de AF por *mag-MIPs* e *mag-NIPs*.



Fonte: A autora, 2021.

Já na **Figura 12**, verificou-se que os dados da isoterma foram ajustados de forma satisfatória usando o modelo de Langmuir. A isoterma de Langmuir contabiliza a cobertura de superfície balanceando as taxas relativas de adsorção e dessorção em uma função linear de C_e vs. C_e/q_e [37].

Figura 12. Isotherma de adsorção de Langmuir para *mag-MIP* com diferentes concentrações de ácido fólico (2 a 12 mg L⁻¹). O tempo de ligação foi de 120 min.



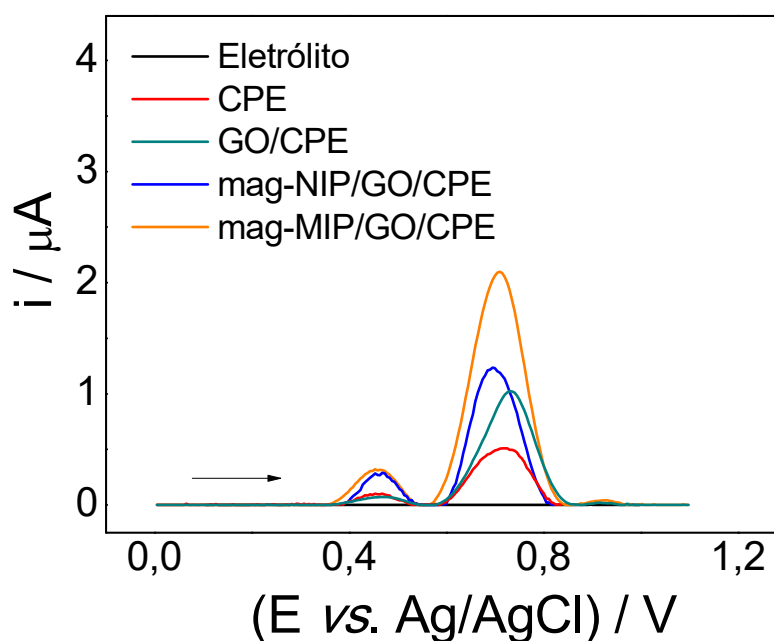
Fonte: A autora, 2021.

5.3 Perfil eletroquímico dos eletrodos por voltametria de onda quadrada (VOQ)

Primeiramente, foi verificado que a pré-concentração não influenciou significativamente na resposta do sensor. Portanto, este parâmetro analítico não foi usado nos experimentos. Em seguida, foram realizados testes comparativos com eletrodos de pasta de carbono (*CPE*), de pasta de carbono modificada com óxido de grafeno (*GO/CPE*), e, por fim, pasta de carbono modificada com óxido de grafeno e com os polímeros sintentizados (*mag-NIP/GO/CPE* e *mag-MIP/GO/CPE*). Para os testes utilizou-se uma concentração de ácido fólico de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A **Figura 15** mostra os perfis voltamétricos dos eletrodos, utilizando tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) como eletrólito. O analito apresentou um pico de corrente anódica característico em torno do potencial de 0,71 V (E vs. Ag/AgCl_{sat}). Os valores para as correntes de pico anódico relacionadas a cada eletrodo são: $0,52 \pm 0,05$ (*CPE*), $1,03 \pm 0,06$ (*GO / CPE*), $1,24 \pm 0,09$ (*mag-NIP/GO/CPE*) e $2,11 \pm 0,07$ (*mag-MIP/GO/CPE*) – todos em triplicata, n = 3.

Portanto, pode-se constatar que o sensor modificado com *mag-MIP* e óxido de grafeno (*GO*) apresentou a melhor resposta eletroquímica (experimentos em triplicata), apresentando um sinal 4, 2 e 1,7 vezes maior quando comparado à resposta dada pelos demais eletrodos: *CPE*, *GO/CPE* e *mag-NIP/GO/CPE*, respectivamente. Assim, observa-se também um significativo aumento do sinal analítico devido à modificação com óxido de grafeno. Já o bom desempenho do eletrodo contendo *mag-MIP* deve ser atribuído à adsorção seletiva do analito, característica não oferecida pelo polímero controle (*mag-NIP*).

Figura 13. Perfil eletroquímico dado por VOQ para os eletrodos (*CPE*, *GO / CPE*, *mag-NIP/GO/CPE* e *mag-MIP/GO/CPE*) na presença de ácido fólico ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e solução tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Condições de VOQ: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.



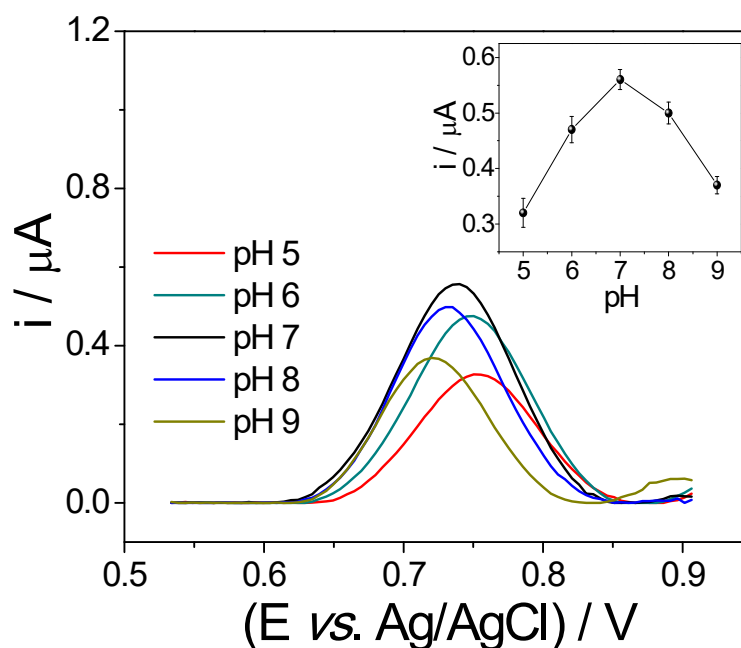
Fonte: A autora, 2021.

5.4 Efeito do pH

Buscando desenvolver um sensor eletroquímico com grande eficiência analítica, o efeito do pH foi estudado nas medições do sensor *mag-MIP/GO/CPE*. O pH ótimo foi escolhido baseado na magnitude da corrente de pico obtida nos experimentos com VOQ. Desse modo, pHs entre 5 a 9 foram estudados em experimentos em triplicata. A **Figura 14** mostra que com aumento do pH da solução de 5 para 7 os potenciais de pico são deslocados para valores de potencial mais baixos e a magnitude da corrente de pico aumenta. Já para pHs superiores a 7, o potencial de pico continua sendo deslocado para

valores inferiores porém o valor da corrente de pico também passa a diminuir. Em pH 7, a forma catiônica é predominante e promove interações eletrostáticas e não covalentes entre o monômero funcional e a molécula de ácido fólico. Assim, o pH 7 foi selecionado para os experimentos posteriores.

Figura 14. Efeito do pH nas medições do sensor *mag-MIP/GO/CPE* utilizando solução de ácido fólico de $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 0.1 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH 7.0). Condições (VOQ) : $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.

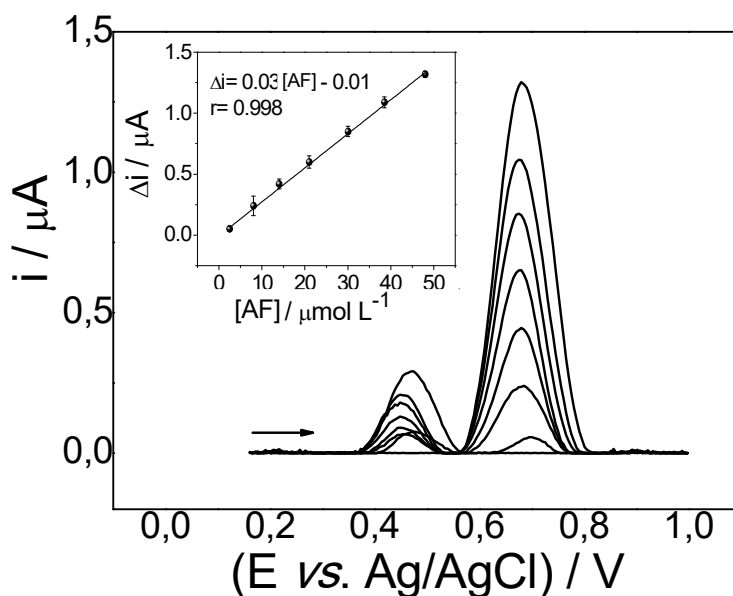


Fonte: A autora, 2021.

5.5 Determinação eletroquímica de ácido fólico via VOQ

A determinação eletroquímica da concentração de ácido fólico também foi obtida por meio da voltametria de onda quadrada (VOQ). Parâmetros de análise de VOQ como amplitude (a), frequência (f) e incremento potencial (ΔE_s) foram previamente otimizados para resultar em um maior sinal analítico. Sob essas condições otimizadas, o sensor *mag-MIP/GO/CPE* apresentou um aumento no sinal analítico proporcional ao aumento da concentração de ácido fólico, fornecendo assim uma curva analítica (**Figura 15**) com uma faixa de concentração linear de $2,5 \times 10^{-6}$ a $48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de $6,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($S/\sigma = 3$). Com base nos resultados, o sensor apresentou ótimo desempenho analítico, revelando alta sensibilidade, repetibilidade e confiabilidade na determinação de ácido fólico.

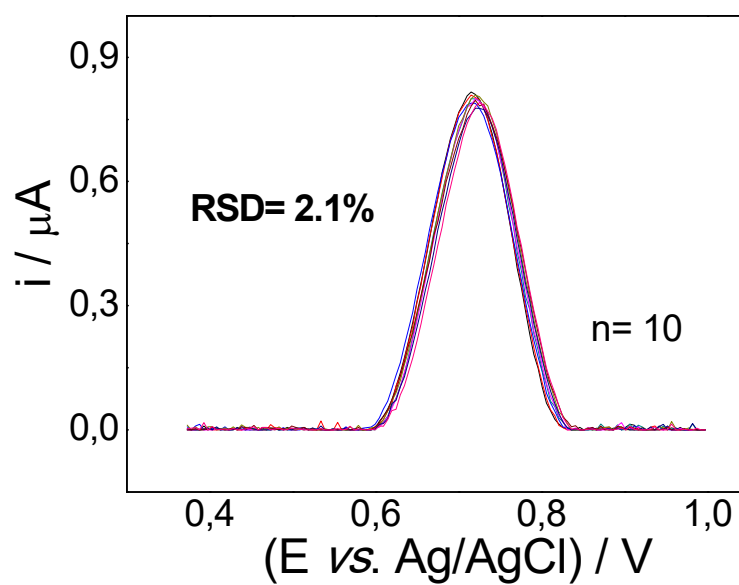
Figura 15. Determinação eletroquímica de ácido fólico por VOQ usando o sensor *mag-MIP/GO/CPE* em solução tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) com sua curva analítica correspondente inserida. Condições VOQ: $f = 10$ Hz, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 5$ mV.



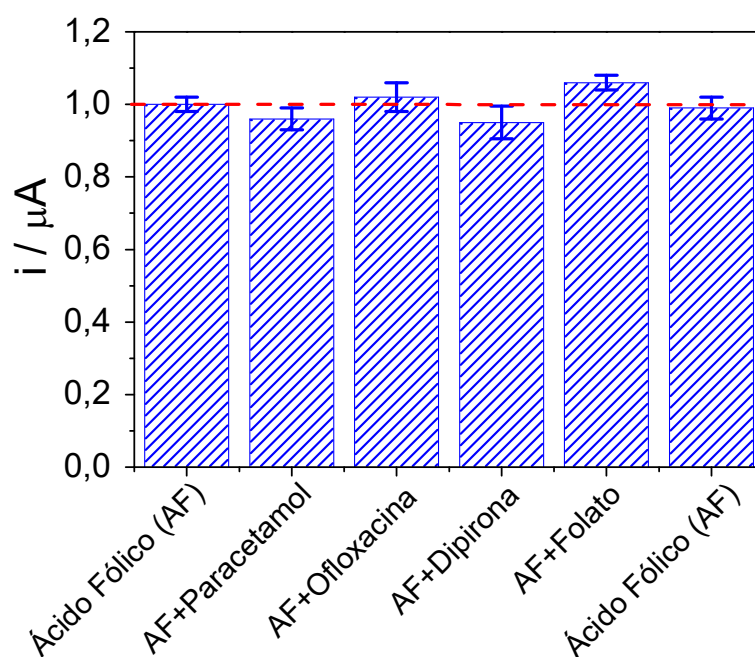
Fonte: A autora, 2021.

5.6 Estudo de seletividade e repetibilidade

A repetibilidade do sinal dado pelo sensor *mag-MIP/GO/CPE*, em determinada concentração de ácido fólico ($2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), também foi verificada por VOQ. Os resultados são mostrados na **Figura 16**, representando 10 medições eletroquímicas nas mesmas condições. O desvio padrão relativo (RSD%) da corrente de pico foi de 2,1%, demonstrando uma excelente precisão e estabilidade nas medidas eletroquímicas fornecidas pelo sensor proposto. Já no estudo de seletividade, a detecção do ácido fólico pelo sensor proposto foi avaliada na presença de outras substâncias: paracetamol, ofloxacina, dipirona e folato. As concentrações dos fármacos analisados foram de $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A **Figura 17**, mostra as interferências causadas por esses compostos no sinal do analito durante o análise por VOQ (em triplicata, $n=3$). O sinal eletroquímico do ácido fólico foi consideravelmente mantido para todas as substâncias analisadas: 95% para o paracetamol, 102% para a ofloxacina, 92% para a dipirona e 106% para o folato. Os resultados comprovam a confiabilidade do sensor proposto na determinação sensível e seletiva de ácido fólico.

Figura 16. Estudo de repetibilidade usando o sensor modificado *mag-MIP/GO/CPE*

Fonte: A autora, 2021.

Figura 17. Estudo de interferentes usando o sensor modificado *mag-MIP/GO/CPE*

Fonte: A autora, 2021.

5.7 Aplicação do sensor em amostras de suplemento vitamínico

As amostras contendo Fosfolin®, suplemento rico em ácido fólico (AF) foram preparadas conforme descrito na *Seção 4.9*. As medidas eletroquímicas foram realizadas adicionando-se 200 uL da solução preparada à cela eletroquímica (concentração de AF de $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Os sinais eletroquímicos obtidos em experimento em triplicata na análise por VOQ foram convertidos através da equação da reta fornecida pela curva analítica da **Figura 10** de modo a determinar a concentração de ácido fólico na amostra diluída – $(2,10 \pm 0,05) \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ que representou um valor de 53,5 mg de ácido fólico (10 comprimidos), apresentando um erro relativo de 7% quando comparado com o valor fornecido pela embalagem (50 mg/10 comprimidos). Os resultados encontrados são resumidos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Concentração de ácido fólico obtida a partir do sinal eletroquímico da amostra real diluída do complexo vitamínico Fosfolin®

Massa de AF em 10 comprimidos de Fosfolin®, dado no rótulo / mg	Concentração detectada no sensor / mol L^{-1}	Massa de AF nos 10 comprimidos / mg	Desvio em relação ao rótulo / %
50	$(2,10 \pm 0,05) \times 10^{-5}$	53,5	7,01

Fonte: A autora, 2021.

5.8 Aplicação do sensor em amostras de água de rios

As amostras de água de rios foram preparadas conforme descrito na *Seção 4.10*. As amostras foram injetadas na célula eletroquímica (capacidade de 10 ml) e foram adicionadas duas concentrações de ácido fólico (10 e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$). O sistema foi então analisado pelo sensor *mag-MIP/GO/CPE*. A **Tabela 3** mostra as concentrações obtidas pelo sensor para o ácido fólico adicionado às amostras do rio, bem como os percentuais de recuperação (96 a 100%). Os erros relativos obtidos na comparação com a concentração de ácido fólico obtida pelo método comparativo (cromatográfico, *HPLC-UV*) também são mostrados (-4 a +3,9%), demonstrando a viabilidade do sensor na determinação e quantificação do analito.

Tabela 3. Resultados obtidos na aplicação do sensor em amostras de água de rio enriquecidas com ácido fólico (duas concentrações). Comparação com o método cromatográfico (HPLC-UV)

Amostras	Concentração* / $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido fólico			Recuperação** (sensor, %)	Erro Relativo*** (%)
	Adição	Sensor proposto	HPLC-UV		
1	10	9,6 $\pm$ 0,2	9,9 $\pm$ 0,1	96	-3
	30	29,4 $\pm$ 0,1	28,3 $\pm$ 0,1	98	+3,9
2	10	9,7 $\pm$ 0,3	10,0 $\pm$ 0,1	97	-4
	30	30,0 $\pm$ 0,1	29,4 $\pm$ 0,1	100	+2

Legenda: *Média de três medidas; **% de recuperação = $[\text{Encontrada} / \text{Adicionada}] \times 100$; ***Erro relativo = $[(\text{Método proposto} - \text{Método Comparativo}) / (\text{Método Comparativo})] \times 100$

Fonte: A autora, 2021.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todas as atividades contempladas nos objetivos específicos e gerais do presente trabalho do projeto foram executadas com êxito, sendo cada grande fonte de aprendizado e conhecimento técnico. O polímero magnético molecularmente impresso seletivo à ácido fólico foi sintetizado com sucesso pelo método do poliol e caracterizado morfológicamente e quimicamente. Os experimentos de ligação mostraram uma maior resposta de adsorção de ácido fólico para o *mag-MIP* (30,4 mg/g) do que para o *mag-NIP* (15,3 mg/g) e as isotermas resultantes seguiram satisfatoriamente o modelo de Langmuir. Já o sensor proposto, eletrodo de pasta de carbono modificado com *mag-MIP* e óxido de grafeno (GO), exibiu excelente resposta na faixa linear entre 2,5 e 48×10^{-6} mol L⁻¹ apresentando um limite de detecção de $6,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Ainda, evidenciou-se que o sensor eletroquímico desenvolvido possui diversas aplicações, oferecendo alta sensibilidade e seletividade, baixo custo, além de alta repetibilidade e reprodutibilidade. Por fim, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ), o sensor quando aplicado em amostras de água de rio e farmacológicas (Fosfolin®) apresentou porcentagens de recuperação próximo de 100 % demonstrando sua viabilidade na determinação de ácido fólico.

REFERÊNCIAS

- [1] 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. Quim. Nova, v. 28, p. 1076-1086, 2005.
- [2] QIAO, F.; SUN, H.; YAN, H.; ROW, K. H. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction. Chromatographia, v. 64, n. 11/12, p. 625-634, 2006. <http://dx.doi.org/10.1365/s10337-006-0097-2>
- [3] FIGUEIREDO, L.; ERNY, G.L., SANTOS, L.; ALVES, A., Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: A review, Talanta. 146, 754-65, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.027>
- [4] ZAMORA-GÁLVEZ et al., Molecularly Imprinted Polymer-Decorated Magnetite Nanoparticles for Selective Sulfonamide Detection, Anal. Chem., v. 88, p.3578–3584, 2016. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04092>
- [5] NARAYANA, P.V. et al. Electrochemical sensing of paracetamol and its simultaneous resolution in the presence of dopamine and folic acid at a multi-walled carbon nanotubes/poly(glycine) composite modified electrode. Royal Society of Chemistry, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4AY02068E>
- [6] LUCOCK, M.; YATES, Z., Folic acid — vitamin and panacea or genetic time bomb?. Nature Reviews, v.6, p.235-240, 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1558>
- [7] SOUZA, M.F.B., Eletrodos Quimicamente Modificados Aplicados À Eletroanálise: Uma Breve Abordagem, Química Nova, 191-195, 1997. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421997000200011>
- [8] BARD, A. J.; Faulkner, L.R., Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, Vol. 2, John Wiley & Sons Inc: New York, 2001.
- [9] MIRZAJANI, R. et al. Construction and Evaluation of a Graphene Oxide Functionalized Aminopropyltriethoxy Silane Surface Molecularly Imprinted Polymer Potentiometric Sensor for Dipyridamole Detection in Urine and Pharmaceutical Samples. Journal Of The Brazilian Chemical Society, 2019. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190097>

- [10] U.S FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA). Folate and Folic Acid on the Nutrition and Supplement Facts Labels. 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/new-nutrition-facts-label/folate-and-folic-acid-nutrition-and-supplement-facts-labels>. Acesso em: 23 set. 2021.
- [11] GRAND VIEW RESEARCH. Folic Acid Market Size, Share & Trends Report Folic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/folic-acid-market>. Acesso em: 23 set. 2021.
- [12] JIN, P. et al. Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in Vitamins with Minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector, J. Pharmaceut. Biomed. Anal., v.70, p.151–157, 2012 . <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.020>
- [13] MATIAS, R. et al.; A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests, Analytical Methods., 2014. <http://dx.doi.org/10.1039/C3AY41874J>
- [14] LIANG, Y.D.; SONG, J.F.; YANG, X.F; Flow-injection chemiluminescence determination of fluoroquinolones by enhancement of weak chemiluminescence from peroxynitrous acid, Anal. Chim. Acta, v.510, p.21–28, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2003.12.054>
- [15] BARD, J.A.; FAULKNER, L.R.; Electrochemical methods: fundamentals and applications, Russ. J. Electrochemistry, 2002.
- [16] UZURIAGA-SÁNCHEZ, R.J et al.; Synthesis of a new magnetic-MIP for the selective detection of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, a highly allergenic compound, Mater. Sci. Eng. C. p. 365–373, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.019>
- [17] 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. 152 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, 2018.

- [18] STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. J. Braz. Chem. Soc., v. 14, n. 3, p. 159-173, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532003000200003>
- [19] PEREIRA, T. C.; Sensores eletroquímicos baseados em polímeros molecularmente impressos sobre superfícies contendo grafeno e nanopartículas metálicas para a determinação de ácidos orgânicos na vinhaça de cana de açúcar. 2019. 113 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química de Araraquara (IQAr), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, 2019.
- [20] MURRAY, R.W.; EWLING, A.G.; Chemically Modified Electrodes Molecular Design for electroanalysis, Anal. Chem., 1987. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00132a001>
- [21] EDWARDS, Grant A. *et al.* Chemically Modified Electrodes. Handbook Of Electrochemistry, p. 295-327, 2007. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-044451958-0.50021-5>.
- [22] WONG, A. *et al.*; A new electrochemical platform based on low cost nanomaterials for sensitive detection of the amoxicillin antibiotic in different matrices. Talanta, v.206, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120252>
- [23] WONG, A. *et al.*; Electrochemical sensor based on graphene oxide and ionic liquid for ofloxacin determination at nanomolar levels. Talanta, v. 161, p. 333-341, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.035>
- [24] RATINAC, K. R. *et al.*; Graphene and related materials in electrochemical sensing. Electroanalysis, v. 23, n. 4, p. 803-826, 2011. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201000545>
- [25] JIANG, Z.; LI, G.; ZHANG, M.; A novel sensor based on bifunctional monomer molecularly imprinted film at graphene modified glassy carbon electrode for detecting traces of moxifloxacin. RSC Adv., v. 6, n. 39, p. 915-921, 2016. <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA01494A>
- [26] SURYANARAYANAN, V.; WU, C-T.; HO, K-C.; Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors. Electroanalysis, v. 22, n. 16, p. 1795-1811, 2010.
- [27] BAHRANI, S. *et al.*; Applications of molecularly imprinted polymers. Interface Science And Technology, p. 655-699, 2021. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-818805-7.00002-3>.

- [28] SELLERGREN, B.; Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry. Amsterdam; New York: Elsevier, v. 23, p. 23-26, 2001.
- [29] GIMBERT, F.; MORIN-CRINI, N.; RENAULT, F.; BADOT, P.-M.; CRINI, G.; Adsorption isotherm models for dye removal by cationized starch-based material in a single component system: Error analysis. Journal of Hazardous Materials, v. 157, 34-46, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.072>
- [30] FONSECA, R. A. et al.; Magnetic *MIPs*: Synthesis and Applications. In: Martín-Esteban A. (eds) Molecularly Imprinted Polymers. Methods in Molecular Biology, Humana: New York, v. 2359, p. 85-96, 2021. http://dx.doi.org.com/10.1007/978-1-0716-1629-1_7
- [31] VEGA-CHACÓN, J. et al.; Influence of synthesis experimental parameters on the formation of magnetite nanoparticles prepared by polyol method. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, v. 7, 2016. <http://dx.doi.org/10.1088/2043-6262>
- [32] HUSSAIN, S. et al.; A novel core@shell magnetic molecular imprinted nanoparticles for selective determination of folic acid in different food samples. Reactive And Functional Polymers, v. 106, p. 51-56, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.07.011>
- [33] GARCIA, S. M. *et al.* ; A simple, sensitive and efficient electrochemical platform based on carbon paste electrode modified with Fe₃O₄@*MIP* and graphene oxide for folic acid determination in different matrices. Talanta, v. 229, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122258>.
- [34] KHAN, S. et al.; Synthesis and characterization of magnetic-molecularly imprinted polymers for the HPLC-UV analysis of ametryn. Reactive And Functional Polymers, v. 122, p. 175-182, 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.11.002>
- [35] WONG, A. et al. Development of an electrochemical sensor modified with MWCNT-COOH and *MIP* for detection of diuron. Electrochimica Acta, v. 182, p. 122-130, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.054>
- [36] KHAN, S. et al. Electrochemical sensors based on biomimetic magnetic molecularly imprinted polymer for selective quantification of methyl green in

environmental samples. Materials Science And Engineering: C, v. 103, 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2019.109825>

[37] QUINTO, M. L. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of a selective molecularly imprinted polymer for quantification of the textile dye acid violet 19 in real water samples. Journal Of Hazardous Materials, v. 384, p. 121374-5, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121374>