



CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE AFM E ESPECTROSCOPIA RAMAN DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS FUNCIONALIZADOS COM NANOPARTÍCULAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ATRAZINA

Ruan S. Santana¹; Samuel A. M. Braga¹; Wesithon A. Lima¹; Denilson O. Menezes¹; Marília de A. Oliveira²; Francisco C. C. S. Salomão³; Bruno S. Araújo⁴; Carlucio R. Alves¹

¹Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências, CCT, e-mail: ruan.santana@aluno.uece.br

¹Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências, CCT, e-mail: Samuel.menezes@aluno.uece.br

¹Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências, CCT, e-mail: wesithon.auday@aluno.uece.br

¹Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências, CCT, e-mail: denilson.oliveira@aluno.uece.br

²Universidade Estadual do Ceará, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, e-mail: marilia.albuquerque@uece.br

³Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências, e-mail: carlos.salomao@uece.br

⁴Universidade Federal do Ceará, Departamento de Física, e-mail: bruno.araujo@fisica.ufc.br

¹Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências, CCT, e-mail: carlucio.alves@uece.br

Palavras-Chave: MIP, Nanotubos de carbono, Voltametria cíclica.

Introdução

A atrazina (ATZ) é um dos herbicidas triazina mais utilizados no mundo, altamente tóxico, representa um risco para o equilíbrio ambiental e para a saúde humana e animal (Oliveira et al., 2024; Yang et al., 2024). Portanto, sua detecção e monitoramento das concentrações permitidas são de vital importância, preferencialmente usando métodos analíticos simples e de custo relativamente baixo. A identificação de atrazina pelo método de polímeros molecularmente impressos (MIPs) tem sido investigada para avaliar sua capacidade de detecção e monitoramento das concentrações permitidas pela ANVISA. Os MIPs são estruturas sintéticas contendo nanocavidades impressas que são capazes de se ligar especificamente a atrazina com alta sensibilidade, seletividade e viabilidade, foram sintetizados pelo método de precipitação, utilizando ácido metacrílico como monômero funcional, dimetacrilato de etilenoglicol como reticulador e atrazina como molécula molde em uma única etapa de polimerização, diferentemente de outras metodologias complexas relatadas na literatura (Marestoni et al., 2013; Sousa & Barbosa, 2009).

A tecnologia de impressão molecular é utilizada para criar sítios de reconhecimento em polímeros sintéticos, utilizando monômeros funcionais com a presença do agente reticulante e a molécula alvo, também chamada de molécula molde (Figueiredo et al., 2008). A posterior remoção do molde leva à formação de sítios de ligação, com uma vacância no formato dessa molécula, que são capazes de se religar especificamente ao seu alvo.

De acordo com a forma de interação entre a molécula do molde e o monômero, o processo de automontagem é geralmente classificado em espécies de impressão covalentes e não covalentes (Belbruno, 2019). O monômero determina o tipo de ligação dos sítios poliméricos impressos, sua escolha depende da molécula molde, e suas interações devem ser fortes o suficiente para formar sítios de ligação, mas também fracas o suficiente para permitir

a remoção do molde sem destruir as cavidades formadas. as interações são ligações não covalentes, em que a quebra entre molde e polímero é feita de forma simples, por desorção, os sítios se tornam menos seletivos, apesar de serem as interações mais utilizadas devido à maior flexibilidade de aplicação de MIPs para diferentes moléculas moldes (Hashim et al., 2014).

As interações nos locais impressos nos MIPs são conferidas pelos monômeros funcionais. Dentre os mais diversos monômeros empregados, o mais utilizado é o ácido metacrílico (MAA) (Horemans et al., 2010; Triikka et al., 2012; Vankatesh et al., 2021). Outro fator importante é o solvente do meio reacional, que deve ser porogênico para facilitar a dissolução da molécula molde e do monômero, promovendo a formação de poros que irão favorecer a difusão do molde nos sítios específicos do polímero (Tarley et al., 2005). A seletividade dos polímeros também é assegurada pelo uso de reagentes de reticulação que promovem reticulações entre as moléculas do monômero, proporcionando controle da morfologia e estabilidade mecânica da matriz polimérica e estabilidade dos sítios de ligação na impressão (Beltran A et al., 2010). O etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), por promover a formação de polímeros termicamente e mecanicamente estáveis e com rápida transferência de massa (Tarley et al., 2005), é eficiente na reticulação de polímeros constituintes de MIPs. O radical iniciador é essencial para iniciar a polimerização, com destaque para o uso do 2,2-azo-bis-butironitrila (AIBN) (Horemans et al. 2010; Triikka et al. 2012).

Os nanotubos de carbono (NanoT) são materiais essenciais na síntese de dispositivos avançados devido à sua excepcional condutividade elétrica, elevada área superficial e resistência mecânica, além da possibilidade de modificação química para melhorar suas propriedades funcionais (Ijeoma; Elom, 2019). Essas características tornam os nanotubos ideais para aplicações em sensores, promovendo maior sensibilidade e especificidade na detecção de analitos (Tarlok; Bishnol, 2018). O objetivo deste trabalho é realizar uma caracterização físico-química abrangente do sensor, com foco em avaliar as propriedades estruturais e funcionais do sistema para otimizar seu desempenho, aprimorando esse dispositivo na detecção de compostos específicos.

Material e Métodos

Síntese do MIP

O MIP foi preparado com base na metodologia descrita na literatura (Horemans et al. 2010). Em um tubo de vidro de 20 mL com tampa, inicialmente foram adicionados 28 mg de atrazina e 15 mL de metanol, seguido de agitação em vórtex por 1 min. Na sequência foram adicionados 38 µL de ácido metacrílico, 170 µL de etileno glicol dimetacrilato e 1,12 mL de 2-2'-azobis(2-metilisopropinitrila). O tubo foi tampado, agitado em vortex por 1 min e, submetido a ultrassom por 10 min. Após esse período a tampa foi retirada e o frasco vedado com parafilm para viabilizar a purga com N₂, por 20 min. O tubo foi tampado, submetido a ultrassom por 5 min e aquecido a 55°C por 24 horas sob agitação. Após o resfriamento do sistema, o material obtido foi centrifugado (6000 rpm por 10 min) e o precipitado obtido foi lavado 3 vezes com etanol e seco em estufa a 35-45 °C por 2 h. A preparação do NIP seguiu o mesmo procedimento sem a presença de atrazina.

Voltametria cíclica

O eletrodo de carbono vítreo utilizado foi limpo sobre fricção em flanela embebida com suspensão de alumina de granulometria 0,3 µm, em movimentos circulares, lavado com água Milli-Q e sonicado por 25 minutos. Solução composta de Ferricianeto de potássio ([Fe

(CN)₆]^{3-/4-}) 4 mM e KCl 1 M foi usada como meio eletrolítico em uma janela de potencial de -0,20 a 0,60 V a 50 mVs⁻¹ para verificar sua limpeza.

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato (Autolab/PGSTAT12), software NOVA (v.4.9.007) e uma célula com três eletrodos, um Ag/AgCl de referência, um auxiliar de platina e um carbono vítreo, como eletrodo de trabalho com 3 mm de diâmetro. Voltamogramas cíclicos foram obtidos usando 4 mM em KCl e solução de ferricianeto de potássio 1 M ([Fe (CN)₆]^{3-/4-}) como meio eletrolítico em uma janela de potencial de -0,20 a 0,80 V a 50 mVs⁻¹ em tampão fosfato pH 7,4. As análises eletroquímicas foram realizadas em triplicata.

Tamanho de partícula e potencial zeta (Pζ)

As soluções previamente preparadas foram levemente homogeneizadas para analisar o tamanho como também o Pζ usando um instrumento dinâmico de espalhamento de luz Zetasizer Nano ZS 3000 da Malvern Instruments (Malvern, Reino Unido) operando com uma luz laser a 633 nm.

Microscopia RAMAN

As medições de espectroscopia Raman foram realizadas em um Espectrômetro Labram HR configurado em geometria retroespalhamento e equipado com um detector syncerity-CCD (Horiba). Todas as fendas foram configuradas para obter uma resolução espectral inferior da ordem de 1 cm⁻¹. A resposta Raman foi obtida usando a linha 633 nm de um laser de He-Ne, focada na amostra por uma objetiva de ampliação de 50x com distância de trabalho de 0,38 mm e abertura numérica de 0,75. A potência do laser na superfície da amostra foi mantida abaixo de 2 mW para evitar o aquecimento local da amostra.

Microscopia de força atômica

As leituras do polímero molecularmente impresso foram realizadas manuseando um microscópio de força atômica (AFM) da marca Nanosurf, utilizando a ponteira Dyn190AL, no modo Dynamic force. O software e a ponteira foram previamente calibrados e alinhados com o laser do equipamento, para uma melhor leitura e precisão das imagens. As amostras foram cuidadosamente preparadas, para que não houvesse nenhuma contaminação. Posteriormente foram fixadas de forma segura na base do aparelho, verificando-se para que estivessem posicionadas corretamente para a análise.

As imagens foram realizadas em uma escala de 2µm. A varredura foi aferida em um tempo médio de 20 minutos para cada amostra e os parâmetros foram sendo ajustados em tempo real conforme as especificidades da leitura. No decorrer do processo, as imagens nos mostram os detalhes de altura e rugosidade.

Resultados e Discussão

Tamanho de partícula e potencial zeta (Pζ)

A investigação do tamanho de partícula foi necessária para confirmar os tamanhos medidos em força atômica. As Figuras 1a e 1b mostram que houve uma distribuição de tamanho com Z-Average de 5,3 e 7,3 µm respectivamente para MIP e NIP. Porém, para ambas as amostras, o diâmetro de pico obtido através do parâmetro de intensidade foi de 0,95 ± 0,01 µm e 1,4 ± 1,2 µm respectivamente. Estes valores muito discrepantes são devido ao índice de polidispersividade (IPD) que está relacionado com a uniformidade no tamanho das

partículas. Os resultados de IPD mostram que o MIP ficou com aspecto mais uniforme (0,218) e o NIP mais polidisperso (0,375). Isso justifica que durante a polimerização com a molécula de atrazina provavelmente formou um material mais organizado.

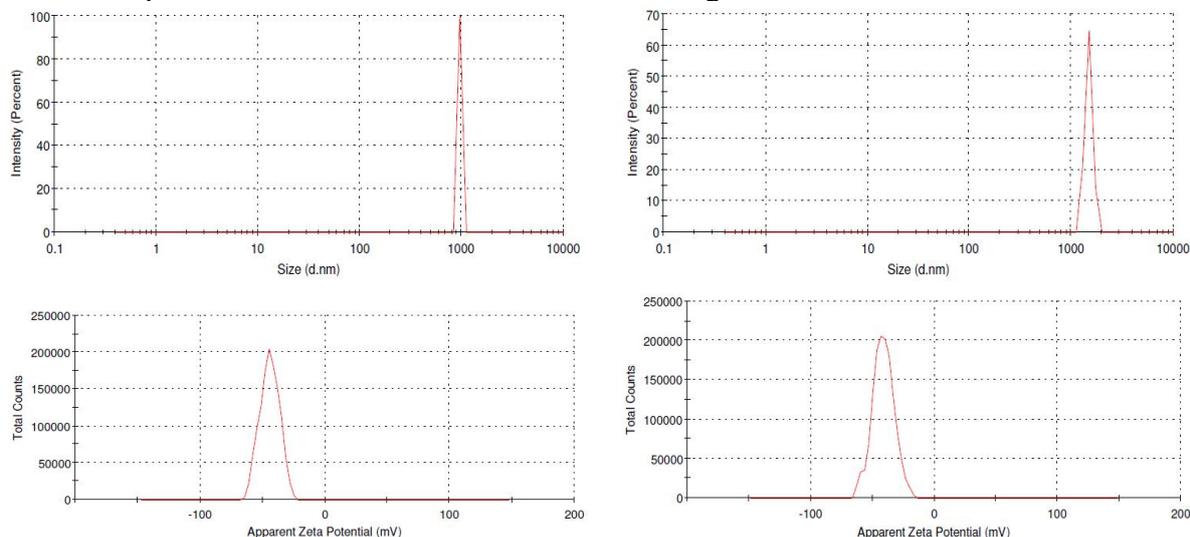


Figura 1. Gráficos de distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta para o MIP (a,c), NIP (b,d).

As Figuras 1c e 1d mostram o perfil do potencial da dupla camada elétrica, potencial zeta. O P ζ para o MIP foi de $-44,4 \pm 7,7$ mV com condutância de $16,0 \mu\text{S}/\text{cm}$, já para o NIP $-40,1 \pm 7,3$ e condutância de $7,48 \mu\text{S}/\text{cm}$. Observa-se que o MIP tem maior estabilidade e maior condutividade elétrica do que o seu controle (NIP), indicando que a superfície dos materiais em análise estão carregados negativamente em sua superfície. Esses dados concordam com a análise de voltametria cíclica.

Voltametria Cíclica

Os voltamogramas demonstraram eficiência do MIP sintetizado e depositado no eletrodo de carbono vítreo para a detecção da atrazina (analito). A Figura 2 mostra os voltamogramas para o eletrodo de carbono vítreo, MIP e NIP. Os valores de corrente de pico para oxidação e redução do MIP ($3,15 \times 10^{-5}$ e $-3,73 \times 10^{-5} \mu\text{A}$) comparados aos valores obtidos para o eletrodo de carbono ($3,74 \times 10^{-5}$ e $-4,25 \times 10^{-5} \mu\text{A}$) confirmam que a imobilização do MIP aconteceu na superfície do eletrodo. No caso do NIP ($3,33 \times 10^{-5}$ e $-3,92 \times 10^{-5} \mu\text{A}$), os picos de oxidação e redução estão entre os obtidos para o MIP e o eletrodo de carbono, evidenciando que o NIP não tem os sítios de ligação específicos para atrazina, mas que ainda pode estabelecer alguma interação com a atrazina. Entretanto, ele não é tão eficiente e seletivo como o MIP, o que é constatado devido às correntes intermediárias na reação de redox.

Tabela 1. valores para picos de corrente (μA) obtidos durante reações redox em três sistemas: eletrodo de carbono vítreo, NIP e MIP.

AMOSTRAS	OXIDAÇÃO	REDUÇÃO
Eletrodo de carbono vítreo	$3,74 \times 10^{-5} \mu\text{A}$	$-4,25 \times 10^{-5} \mu\text{A}$
NIP	$3,33 \times 10^{-5} \mu\text{A}$	$-3,92 \times 10^{-5} \mu\text{A}$
MIP	$3,15 \text{ vs } 10^{-5} \mu\text{A}$	$-3,73 \times 10^{-5} \mu\text{A}$

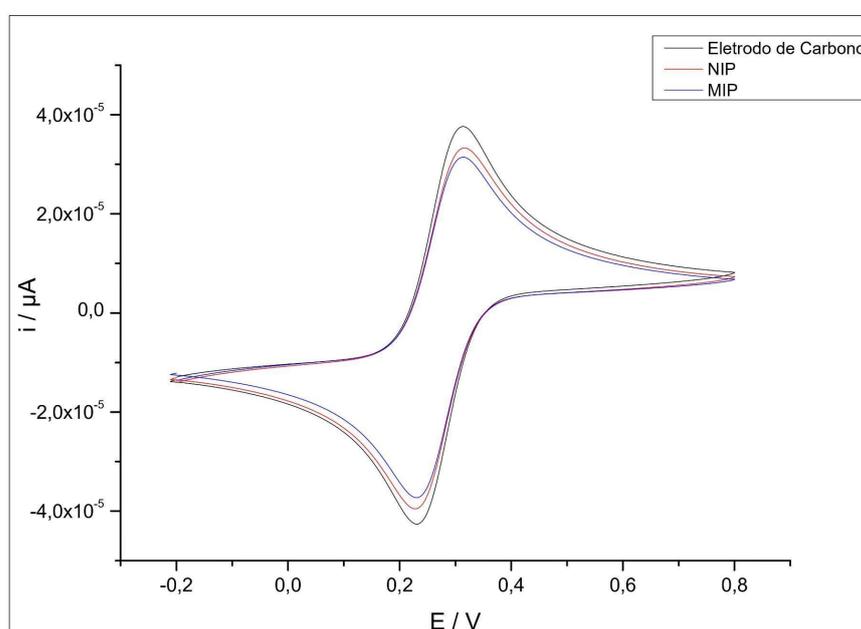


Figura 2. Gráfico de voltametria cíclica para eletrodo de carbono, MIP e NIP, indicando os picos de oxirredução através da corrente na faixa de potencial de -0,2 a 0,8V.

Microscopia Raman

O espectro de atrazina apresenta, na Figura 3, estiramento da ligação C-N-C e N-C-N do anel em 650 e 700 cm^{-1} respectivamente, a vibração da ligação C-Cl acontece em torno de 600 cm^{-1} . O sinal forte que ocorre em 900 cm^{-1} é referente a vibração das ligações de CH_3 e C-C. Em 950 cm^{-1} ocorre a deformação angular de $\text{CH}_3\text{-C-CH}_3$. O espectro do MIP-SA em três regiões diferentes, observou semelhança nos deslocamentos com o espectro de MIP e variação na intensidade da banda devido a distribuição heterogênea da amostra. No entanto, as bandas largas com picos em torno de 1450 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} referente ao espectro do NIP, o controle da reação, representam as ligações poliméricas, reforçando as bandas com mesmo deslocamento para os espectros do MIP-SA e MIP. A Tabela 3 sumariza os deslocamentos com seus respectivos tipos de vibração.

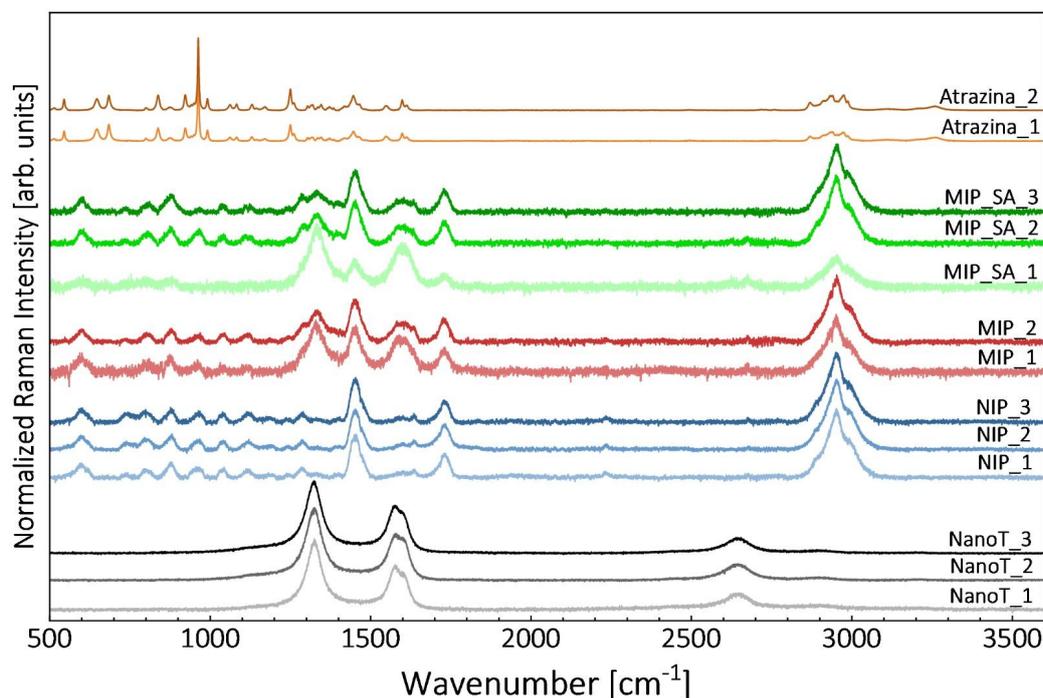


Figura 3. Espectros Raman das amostras de atrazina, MIP-SA, MIP, NIP e NanoT. Foram realizadas leituras em diferentes regiões das amostras, mostrando variações nos perfis espectrais e intensidades, refletindo a composição e estrutura de cada material analisado.

Os espectros Raman não mostram diferenças significativas nas intensidades das bandas D e G. Esse cálculo comparativo é necessário pois mostra o número de defeitos superficiais e sítios ativos formados pela formação de estruturas de carbono como resultado de cada modificação, o que aumentará a condutividade do eletrodo modificado (MA et al., 2021).

Tabela 2. Atribuições vibracionais de bandas características da Atrazina, MIP, MIP-SA e NanoT. Os símbolos os tipos de vibração: δ (deformation), ν (stretching), τ (twisting) e ω (wagging).

Deslocamentos (cm^{-1})	Modo vibracional das bandas
650	$\delta(\text{C-N-C})$, $\nu(\text{C-Cl})$
700	$\delta(\text{N-C-N})$
840	$\nu(\text{C-C})$, $\omega(\text{CH}_3)$
900	$\nu(\text{C-C})$
950	$\delta(\text{H}_3\text{C-C-CH}_3)$, $\omega(\text{CH}_3)$
1255	$\tau(\text{CH}_2)$
1433	$\delta(\text{CH}_3)$
1544	$\delta(\text{NH})$

A Tabela 2 mostra as intensidades das bandas D e G indicam como prova de oxidação ou indução de defeitos na rede de carbono do grafite o deslocamento Raman. A banda D dos eletrodos de carbono está centrada entre 1330 e 1340 cm^{-1} , indicando a presença de defeitos no material como: defeitos, *strain* ou dopagens, enquanto as bandas G e G', relacionadas às ligações C=C (MIKAC et al., 2021) indicam presença de hibridização sp^2 através de duas características marcantes das vibrações e estão localizadas por volta de 1580 cm^{-1} e $2650 - 2800\text{ cm}^{-1}$. Isso também mostra localizações de pico semelhantes para as bandas D e G, indicando que cada modificação afeta as cavidades ativas formadas na superfície do MIP.

Tabela 3. Valores de I_D/I_G indicam a razão entre as intensidades da banda D (I_D) e da banda G (I_G) para MIP-SA, MIP e NanoT. Os valores variam entre as amostras, destacando possíveis diferenças nas interações moleculares apresentadas.

Amostra	Espectro 1	Espectro 2	Espectro 3
MIP_SA	1.91582	1.86099	2.57675
MIP	1.71535	1.87993	-
NanoT	1.70702	1.78413	1.67435

Microscopia de Força Atômica

Conforme a Figura 4, as micrografias de NIP, MIP e MIP-SA apresentam diferenças evidentes. O MIP, projetado para interagir com um analito específico (atrazina), mostra uma rugosidade mais complexa (Fig. 4a) com cavidades ou padrões específicos que correspondem a atrazina, observa-se claramente a intercalação com os nanotubos de carbono por toda a amostra. Enquanto o NIP (Fig. 4b) apresenta uma superfície parecida com a de um polímero padrão, exibindo uma superfície mais uniforme com menos diferenciação entre polímero e nanotubos. Comparado ao NIP, o MIP destaca-se por uma rugosidade mais acentuada e uma estrutura de superfície irregular que reflete sua especialização.

Entre o MIP e MIP-SA, a rugosidade parece ser semelhante, mas o MIP-SA pode apresentar diferenças sutis nas cavidades devido à ausência da atrazina. Essas variações ajudam a entender como a presença da atrazina e sua posterior retirada impacta na estrutura final do MIP, oferecendo *insights* sobre a eficácia do processo de impressão molecular.

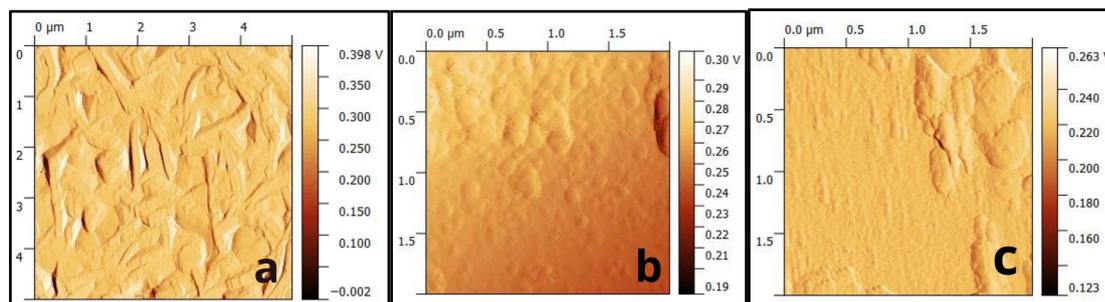


Figura 4. Micrografias de AFM para o (a) MIP, (b) NIP e (c) MIP-SA, realizadas no modo de contato, em tempo médio de 20 minutos.

Conclusões

Este trabalho demonstrou a viabilidade da síntese de um sensor baseado em MIP para detecção de atrazina, as técnicas utilizadas para caracterização comprovaram o potencial deste sensor como um dispositivo para aplicação prática na detecção de atrazina, auxiliando efetivamente no controle ambiental e supervisão do herbicida contaminante.

Agradecimentos

FINEP, CNPq, CAPES e FUNCAP.

Referências

- BELBRUNO, J. J. Molecularly Imprinted Polymers. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 1, p. 94–119, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>
- BELTRAN A; BORRUL F; CORMACK PAG; MARCÉ RM. Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1363–1375, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.020>
- FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: Uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 361–375, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300005>
- HASHIM, S. N. N. S.; REINHARD I. BOYSEN; LACHLAN J. SCHWARZ; BASIL DANYLEC; MILTON T.W. HEARN. A comparison of covalent and non-covalent imprinting strategies for the synthesis of stigmasterol imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1359, p. 35–43, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.034>
- HOREMANS; ALENUS J; THOELLEN R; DUCHATEAU J; LUTSEN L; VANDERZANDE D; WAGNER P; CLEIJ TJ. MIP-based sensor platforms for the detection of histamine in the nano- and micromolar range in aqueous media. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 148, p. 392–398, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.05.003>
- MA, J. et al. An overview on molecular imprinted polymers combined with surface-enhanced Raman spectroscopy chemical sensors toward analytical applications. **Talanta**, v. 225, p. 122031, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122031>
- MARESTONI, L. D.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; SEGATELLI, M. G.; SARTORI, L. R.; TARLEY, C. R. T. Polímeros impressos com íons: fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1194–1207, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000800018>
- MIKAC, L.; KOVAČEVIĆ, E.; UKIĆ, Š.; RAIĆ, M.; JURKIN, T.; MARIĆ, I.; GOTIĆ, M.; IVANDA, M. Detection of multi-class pesticide residues with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 252, p. 119478, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119478>
- OLIVEIRA, W. de L.; MOTA, T. F. M.; DA SILVA, A. P.; OLIVEIRA, R. D. de L.; COMELLI, C. L.; ORLANDINI, N. D.; ZIMMER, D. F.; DE OLIVEIRA, E. C.; GHISI, N. de C. Does the atrazine increase



animal mortality: Unraveling through a meta-analytic study. **Science of The Total Environment**, v. 951, p. 175553, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175553>

SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controle da liberação de fármacos. Parte 1: síntese e caracterização. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1609–1619, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600045>

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, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600024>

TRIKKA, F. A.; YOSHIMATSU, K.; YE, L.; KYRIAKIDIS, D. A. Molecularly imprinted polymers for histamine recognition in aqueous environment. **Amino Acids**, v. 43, n. 5, p. 2113–2124, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1297-8>

VANKATESH, S.; CHI-CHUNG YEUNG; TAN LI; SIU CHUEN LAU; QI-JUN SUN; LING-YI LI; JIN HUA LI; MICHAEL H.W.LAM; VELLAISAMY A.L.ROY. Portable molecularly imprinted polymer-based platform for detection of histamine in aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 410, p. 124609, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124609>

YANG, Y.-F.; CHENG, S.-Y.; WANG, Y.-L.; YUE, Z.-P.; YU, Y.-X.; CHEN, Y.-Z.; WANG, W.-K.; XU, Z.-R.; QI, Z.-Q.; LIU, Y. Accumulated inflammation and fibrosis participate in atrazine induced ovary toxicity in mice. **Environmental Pollution**, v. 360, p. 124672, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124672>