

Optosensores baseados em membranas de materiais de origem marinha

Patrícia Raquel Martins dos Santos

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

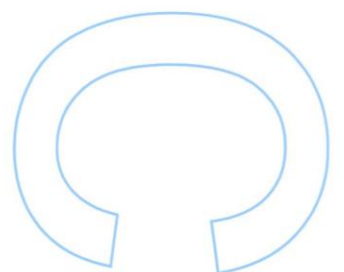
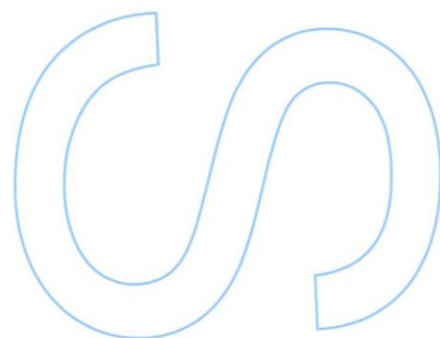
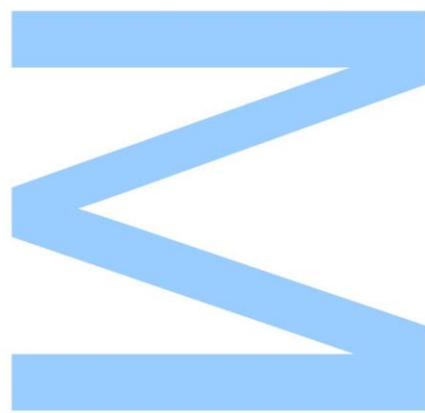
2019

Orientador

Doutor Manuel Augusto Gomes de Oliveira Azenha,
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade
do Porto

Coorientador

Doutor Carlos Manuel de Melo Pereira, Professor Associado,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Agradecimentos

Nesta tese de mestrado estão representados cinco anos de estudo e trabalho que culminaram num projeto final, em que foi necessário aplicar o conhecimento adquirido ao longo deste período. Através desta dissertação, consegui desenvolver novas aptidões que vou levar comigo para a vida, aprendi novos métodos de trabalho e como aplicá-los, mas nada disto seria possível sem todo o apoio que tive. Apoio este que me ajudou a evoluir tanto a nível profissional como pessoal.

Antes de mais, quero agradecer ao Professor Doutor Manuel Azenha pelo seu trabalho como meu orientador, o acompanhamento e 100 % de disponibilidade para tudo o que foi necessário no decorrer desta dissertação. Permitiu-me crescer como profissional, sempre dando o seu apoio total. Agradeço, também, ao Professor Doutor Carlos Pereira por acompanhar este projeto, ajudando no seu desenvolvimento.

No decorrer desta tese, pude conviver diariamente em laboratório com outras investigadoras, querendo deixar o meu agradecimento em especial à Mestre Vanessa Ferreira, que sempre se disponibilizou para procurar soluções para os obstáculos encontrados ao longo deste período, que através de diferentes ideias tornou possível chegar a conclusões. Proporcionando-me sempre um bom ambiente de trabalho.

Agradeço à minha família, em particular aos meus pais e avós, que me proporcionaram todas as condições para que fosse possível a realização da tese.

Por fim, quero agradecer em especial ao meu namorado, por ter sido o pilar fundamental destes 5 anos. Quando nada parecia dar certo, sempre me fez ver o lado positivo, motivou-me a dar sempre o meu melhor e acreditou em mim. Fez-me manter os pés na Terra, mas sempre me fazendo acreditar que o impossível se tornaria possível. Agradeço-lhe toda a paciência, carinho e apoio incondicional ao longo destes anos.

Resumo

Nos últimos anos, houve um declínio nos recursos naturais, bem como um aumento no impacto negativo que as empresas possuem sobre o meio ambiente, o que levou ao surgimento de uma "economia circular e sustentável". Dentro deste tema, o objetivo do presente trabalho é o uso de componentes extraídos de resíduos ou subprodutos da indústria pesqueira, a fim de explorar a sua potencial aplicação na síntese de membranas para uso posterior em áreas como sensores óticos de metais pesados baseados em membranas de biopolímeros.

A síntese das membranas foi baseada no uso de polissacarídeos, como quitosano, sulfato de condroitina e fucoidano, extraídos dos resíduos, principalmente da carapaça de crustáceos, espinhas de peixes e algas marinhas, respetivamente. Diferentes membranas foram sintetizadas, uma baseada em quitosano e siloxanos, otimizando uma síntese já descrita na literatura e adaptando-a, e outras simultaneamente com dois biopolímeros, quitosano com fucoidano ou com sulfato de condroitina, ajustando o método usado para a membrana anterior. Devido às estruturas químicas flexíveis desses biopolímeros, tentou-se usar a impressão molecular de Pb(II) a fim de melhorar a seletividade e a capacidade dessas membranas para com esta espécie, uma vez que estes biopolímeros são conhecidos de outros estudos por já possuírem grande afinidade por este catião metálico. As membranas sintetizadas foram ainda caracterizadas utilizando diferentes técnicas, como FTIR e TGA.

Uma vez que o objetivo final foi aplicar estas membranas a um sensor ótico, estudou-se a incorporação de um cromóforo nas diferentes membranas e a sua otimização. O cromóforo escolhido foi a ditizona, pois é conhecida por ter uma boa interação com Pb(II), traduzindo-se num bom sinal através da alteração de cor. Além disso, foi estudada a variação da absorvância no visível das membranas sensoras após contacto com o catião chumbo, e foi possível observar uma melhoria no sinal de 900 % e 230 % para as membranas com fucoidano e sulfato de condroitina, respetivamente, em comparação com a membrana com apenas quitosano. Quanto aos limites de deteção para as membranas de fucoidano e sulfato de condroitina, 1,2 ppm e 4 ppm, respetivamente, foram bastante inferiores ao obtido para a membrana formada apenas por quitosano, 13 ppm.

Palavras-chave: membranas, biopolímeros, quitosano, sulfato de condroitina, fucoidano, sensores óticos, optosensores, UV-Vis e catião chumbo.

Abstract

In recent years, there has been a decline in natural resources, as well as an increase in the negative impact that companies wastes have on the environment, which has led to the emergence of a "circular and sustainable economy". Within this theme, the objective of the present work is the use of components extracted from wastes or by-products of the fishery industry in order to explore its potential application in membrane synthesis for later use in areas such as optical sensors of heavy metals based on membranes of biopolymers.

The preparation of the membranes was based on the use of polysaccharides, such as chitosan, chondroitin sulfate and fucoidan, extracted from wastes, especially crustaceans shells, fish and brown seaweed, respectively. Different membranes were synthesized, one based on chitosan and siloxanes, optimizing one synthesis already described in literature and adapting it, and others simultaneous with two biopolymers, chitosan with fucoidan or with chondroitin sulfate, by adjusting the used method for the previous membrane. Due to the flexible chemical structures of these biopolymers molecular imprinting of Pb(II) was tested in order to improve the selectivity and capacity of these membranes for this specie, since it was proved in previous studies that these biopolymers had already great affinity for this metal cation. The synthesized membranes were further characterized using different techniques such as FTIR e TGA.

Since the final goal was to apply these membranes to an optical sensor, the incorporation of a chromophore to the different membranes was also studied and optimized. The chromophore chosen was dithizone, since it has been known to have a good interaction with Pb(II), and translating it to a good signal due to its change in colour. Furthermore, the change in absorbance in the sensor membranes after contact with the metal cation was studied, and it was possible to see an improvement in signal of 900 % and 230 % for the membranes with fucoidan and chondroitin sulfate, respectively, in comparation with the membrane with only chitosan. As for the detection limits for fucoidan and chondroitin sulphate membranes, 1.2 ppm and 4 ppm, respectively, were much lower than that obtained for the chitosan-only membrane, 13 ppm.

Keywords: membranes, biopolymers, chitosan, chondroitin sulfate, fucoidan, optical sensors, optosensors, UV-Vis and lead cation.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Lista de tabelas	IX
Lista de figuras	XI
Lista de Abreviaturas	XV
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Sensores baseados em membranas	6
1.1.1. Membranas de biopolímeros de origem marinha	6
1.1.2. Impressão molecular	15
1.2. Sensores óticos de catiões metálicos	18
1.2.1. Sensores óticos para o catião chumbo	22
1.3. Objetivo da dissertação	26
Capítulo 2 - Técnicas instrumentais	27
2.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com reflexão total atenuada (ATR)	27
2.2. Análise Termogravimétrica (TGA)	29
2.3. Espectroscopia de absorção atómica (AAS)	30
2.4. Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	32
Capítulo 3 - Procedimento experimental	35
3.1. Síntese e caracterização de membranas	35
3.1.1. Materiais e reagentes	35
3.1.2. Instrumentação	35
3.1.3. Procedimentos	36
3.2. Desenvolvimento de membranas sensoras para Pb(II)	44

3.2.1. Materiais e reagentes	44
3.2.2. Instrumentação	45
3.2.3. Procedimentos	45
3.3. Avaliação da membrana sensora para Pb(II).....	48
3.3.1. Materiais e reagentes	48
3.3.2. Procedimento	48
Capítulo 4 - Resultados e discussão	51
4.1. Desenvolvimento da síntese de membranas	51
4.2. Caracterização das membranas	60
4.3. Desenvolvimento de membranas sensoras para Pb(II)	73
4.4. Avaliação do desempenho das membranas sensoras.....	86
Conclusão	101
Referências bibliográficas	103

Listas de tabelas

Tabela 1 - Principais sistemas de transdução em sensores químicos e as suas respectivas técnicas de medição. Adaptado da referência [3].....	2
Tabela 2 - Limites de Pb(II) em água potável e no ar para as respectivas agências.	20
Tabela 3 - Sensores óticos para deteção de chumbo (apenas na gama do visível)	22
Tabela 4 - Capacidade de adsorção de Pb(II) (mg/g) de metais por materiais de quitosano, sulfato de condroitina e fucoidano.	25
Tabela 5 - Volumes e concentrações das respectivas soluções e proporções em nº de moles estudadas para Glut:CH	37
Tabela 6 - Volumes e concentrações das respectivas soluções e proporções em nº de moles estudadas para Gli:CH	38
Tabela 7 - Estudo das quantidades e proporções de biopolímeros	39
Tabela 8 - Resumo sínteses finais	40
Tabela 9 - Diferentes concentrações e tempos de imersão na solução de ditizona	47
Tabela 10 - Parâmetros da complexação para os biomateriais a incorporar nas membranas, para os catiões Pb(II) e Cd(II)	52
Tabela 11 - Aspeto das soluções perante as diferentes proporções (CS/Fd:CH)	53
Tabela 12 - Proporções de moles de glutaraldeído por moles de monómero de quitosano e o seu efeito no grau de inchamento para a membrana de CH-SiO ₂	55
Tabela 13 - Proporções de glicerol e monómero de quitosano, em nº de moles, e o seu efeito na maleabilidade da membrana CH-SiO ₂	57
Tabela 14 - Efeito do volume de deposição na espessura da membrana e nas suas propriedades mecânicas.....	59
Tabela 15 - Resumo de espessuras e massas de cada membrana de acordo com o volume de deposição	60
Tabela 16 - Ligações principais dos diferentes componentes e respectivas frequências de vibração	62
Tabela 17 - Efeito das diferentes concentrações de glutaraldeído na impregnação da ditizona e propriedades mecânicas da membrana	76

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema da estrutura de um sensor	2
Figura 2 - Esquema ilustrativo entre analito e o sensor.....	3
Figura 3 - Esquema da estrutura da fibra ótica com designação dos seus componentes	4
Figura 4 - Tipos de fibra ótica	5
Figura 5 - Sensores extrínsecos vs sensores intrínsecos	6
Figura 6 - Desacetilação da quitina.....	8
Figura 7 - Esquema da constituição da cartilagem.....	9
Figura 8 - Estrutura química de diferentes tipos de sulfato de condroitina	10
Figura 9 - Estrutura química mais comum do fucoidano	11
Figura 10 - Esquema de possível reticulação entre quitosano e glutaraldeído, glutaraldeído liga-se através do grupo amina do quitosano, libertando-se uma molécula de água na reação.....	12
Figura 11 - Representação esquemática de rede sol-gel, com representação das pontes de siloxano, e unidades estruturais T^n , onde n representa o número de ligações com grupos orgânicos na formação do organossilano e Q^n , onde n representa o número de pontes de siloxano que aquele átomo de sílica forma retirado da referência [31]	13
Figura 12 - Esquema de impressão molecular de polímeros, passo inicial da interação dos monómeros com o template, seguida da polimerização dos monómeros, por fim remoção do template, criando um local de reconhecimento. Adaptado da referência [36] – livre para reprodução e adaptação.....	16
Figura 13 - Esquema exemplo de impressão molecular de polissacarídeos, nomeadamente fucoidano. Realizada a reticulação entre as cadeias através do GPTMS - (3-glicidiloxipropil) trimetoxissilano, que realiza a ponte entre as cadeias de fucoidano e a sílica, através dos grupos OH destes compostos. I – Fucoidano, II – GPTMS, III - TMOS. Adaptado da referência [39]	17
Figura 14 - Estrutura química da ditizona.....	24
Figura 15 - Esquema de possível ligação entre ditizona e catião metálico.....	24
Figura 16 - Representação esquemática do funcionamento do FTIR.....	28
Figura 17 - Esquema de funcionamento de acessório ATR	29
Figura 18 - Esquema de espectroscopia de absorção atómica adaptado de http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/labmatters/instruments/aa/aa.htm	31

Figura 19 - Esquema da síntese, representação dos passos de adição das diferentes soluções	40
Figura 20 - Exemplo de membrana maleabilidade aceitável	42
Figura 21 - Exemplo de método utilizado para determinar altura e área da banda a 550 nm (a) e a 460 nm (b)	48
Figura 22 - Isotérmica para o fucoidano, sulfato de condroitina e quitosano	52
Figura 23 - Turvações formadas na síntese para a membrana de sulfato de condroitina a) e fucoidano b)	54
Figura 24 - Imagem exemplo uma membrana de quitosano e sílica com excesso de glutaraldeído (1,5:1 – Glut:CH)	56
Figura 25 - Possível representação esquemática da impressão molecular para a membrana CH-Fd. De modo a simplificar não estão representados o glicerol e o glutaraldeído	58
Figura 26 - Espetros de FTIR para os componentes individuais CH, CS, Fd e SiO ₂ e principais bandas assinalados	61
Figura 27 - Espetro de FTIR do glicerol retirado de [96]	61
Figura 28 - Espetros de IV para os materiais não impressos	63
Figura 29 - Representação gráfica dos espectros normalizados de FTIR de CH-SiO ₂ NIM e MIM	64
Figura 30 - Representação gráfica dos espectros normalizados de FTIR de CH-Fd NIM e MIM	64
Figura 31 - Representação gráfica dos espectros normalizados de FTIR de CH-CS NIM e MIM	65
Figura 32 - Representação gráfica de curva TG de CH- SiO ₂ e seus componentes....	66
Figura 33 - Representação dos gráficos de DTG de CH-SiO ₂ e seus constituintes....	67
Figura 34 - Representação dos gráficos de DTG de CH-SiO ₂ NIM e MIM	68
Figura 35 - Gráficos de TG de CH-CS e seus componentes	69
Figura 36 - Gráficos de DTG de CH-CS e seus componentes	70
Figura 37 - Gráficos DTG de CH-CS NIM e MIM	71
Figura 38 - Gráficos de TG de CH-Fd e seus componentes.....	71
Figura 39 - Gráficos de DTG de CH-Fd e seus componentes	72
Figura 40 - Gráficos de DTG de CH-Fd NIM e MIM	73
Figura 41 - Membrana CH-Fd previamente deixada em água desionizada a) e não deixada b)	74
Figura 42 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para CH-SiO ₂ sem e com ditizona	75
Figura 43 - Esquema de ligação da ditizona à membrana adaptado de [107]	76

Figura 44 - Membrana CH-SiO ₂ sem imersão em glutaraldeído a), e com imersão b)	77
Figura 45 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis das membranas de CH-SiO ₂ com ditizona com e sem imersão prévia em glutaraldeído	78
Figura 46 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis para as membranas imergidas em soluções com diferentes concentrações de ditizona	79
Figura 47 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis para as membranas imergidas em soluções com diferentes concentrações de ditizona e posterior imersão em 10 ppm de Pb(II)	79
Figura 48 - Membrana na cuvete antes da imersão em solução de catião chumbo a) e após a imersão b) (alteração no centro onde esteve em contacto com a solução, passando de laranja para um tom rosa muito subtil.	80
Figura 49 - Variação da absorvância máxima a) e área b) da banda a 550 nm, em função da concentração de ditizona.....	80
Figura 50 - Variação do módulo do decréscimo da absorvância a) e área b) da banda a 460 nm, em função da concentração de ditizona	81
Figura 51 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis para a membrana CH-SiO ₂ imersa por diferentes tempos em 0,25 mmoldm ⁻³ de ditizona	82
Figura 52 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis para as membranas imergidas diferentes tempos na mesma concentração de ditizona e posterior imersão em 10 ppm de Pb(II)	82
Figura 53 - Variação da absorvância máxima a) e área b) da banda a 550 nm, em função do tempo de imersão na solução de ditizona	83
Figura 54 - Variação do módulo do decréscimo da absorvância a) e área b) da banda a 460 nm, em função do tempo de imersão na solução de ditizona.....	83
Figura 55 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis para as membranas imergidas por diferentes tempos na solução 10 ppm de Pb(II).....	84
Figura 56 - Variação da absorvância máxima a) e área b) da banda a 550 nm, em função do tempo de imersão na solução de Pb(II)	85
Figura 57 - Variação do módulo do decréscimo da absorvância a) e área b) da banda a 460 nm, em função do tempo de imersão na solução de Pb(II)	85
Figura 58 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis para as membrana CH-SiO ₂ imersa em soluções com diferentes concentrações de Pb(II)	86
Figura 59 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis para as membrana CH-CS (1:210) imersa em soluções com diferentes concentrações de Pb(II)	87
Figura 60 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis para as membrana CH-Fd (1:490) imersa em soluções com diferentes concentrações de Pb(II)	87

Figura 61 - Curvas de calibração da variação absorvância máxima da banda a 550 nm, em função da concentração de Pb(II) para CH-SiO ₂ , CH-CS (1:210) e CH-Fd (1:490)	88
Figura 62 - Curvas de calibração da variação da absorvância da banda a 460 nm, em função da concentração de Pb(II) para CH-SiO ₂ , CH-CS (1:210) e CH-Fd (1:490)	88
Figura 63 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membrana CH-CS imersa em soluções com diferentes concentrações de Pb(II)	90
Figura 64 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membrana CH-Fd imersa em soluções com diferentes concentrações de Pb(II)	90
Figura 65 - Curvas de calibração da variação da absorvância máxima da banda a 550 nm, em função da concentração de Pb(II) para CH- SiO ₂ , CH-CS (1:42) e CH-Fd (1:48)	91
Figura 66 - Curvas de calibração da variação da absorvância da banda a 460 nm, em função da concentração de Pb(II) para CH- SiO ₂ , CH-CS (1:42) e CH-Fd (1:48)	91
Figura 67 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para o sensor CH-Fd NIM e MIM imersos em 10 ppm de Pb(II)	93
Figura 68 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para o sensor CH-CS NIM e MIM imersos em 10 ppm de Pb(II)	93
Figura 69 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis do sensor de CH-CS NIM e MIM para as mesmas condições de incorporação de ditizona	94
Figura 70 - Aspeto visual da membrana CH-CS NIM a) e MIM b)	94
Figura 71 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membrana CH-SiO ₂ imersa em soluções com diferentes concentrações de Cd(II)	95
Figura 72 - Comparação dos espectros de UV-Vis para a membrana CH-SiO ₂ imersa em 10 ppm de Cd(II) e 10 ppm de Pb(II)	96
Figura 73 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis da membrana CH-SiO ₂ imersa numa solução com diferentes concentrações de Pb(II) e 5 ppm de Cd(II)	97
Figura 74 - Variação da absorvância máxima da banda a 550 nm, em função da concentração de Pb(II) para CH- SiO ₂	97
Figura 75 - Variação da absorvância máxima da banda a 420 nm, em função da concentração de Pb(II) para CH- SiO ₂	98

Lista de Abreviaturas

AAS - Espectroscopia de absorção atômica

ACDA - Ácido 2-amino-ciclopenteno-1-ditiocarboxílico

ATR - Refletância total atenuada

CH - Quitosano

CS - Sulfato de condroitina

DMSO - Dimetilsulfóxido

DRIFTS - Espectroscopia de refletância difusa

DTG - Termogravimetria derivada

DTZ - Ditizona

Fd - Fucoïdano

FTIR - Infravermelho com transformada de Fourier

GAG - Glicosaminoglicano

GalNAc - N-acetilgalactosamina

GlcA - Ácido glucurónico

Gli - Glicerol

Glut - Glutaraldeído

GPTMS - 3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

MIM - Material molecularmente impresso

MMF - Fibras multimundo

NIM - Material não-impresso

PVC - Policloreto de vinilo

SMF - Fibras de modo único

SPR - Ressonância plasmónica superficial

TG - Termogravimetria

TGA - Análise termogravimétrica

TIR - Refletância interna total

TMOS - Tetraetilortosilicato

UV - Ultravioleta

UV-Vis - Ultravioleta-Visível

Capítulo 1 - Introdução

Nos últimos anos, foram introduzidos no mercado dispositivos menores, portáteis e menos dispendiosos, em comparação com outros equipamentos laboratoriais, os sensores. Estes possuem sensibilidade e seletividade comparáveis à instrumentação já existentes, tornando-os uma escolha atrativa em comparação aos métodos clássicos, devido à sua instrumentação menos complexa e período de medição mais curto, sem necessidade de tratamento prévio da amostra [1]. Com a introdução da fibra ótica, os sensores óticos sofreram um avanço, pois tornaram-se mais rápidos e eficazes [2]. Nesta dissertação é apresentado o trabalho realizado sobre o desenvolvimento de membranas para aplicação em optosensores com base em biopolímeros extraídos de desperdícios marinhos.

Sensores químicos

Um sensor é um dispositivo que permite a deteção de um ou mais analitos, através da produção de um sinal, que pode ser ótico, elétrico, térmico, entre outros. Segundo a definição da IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*, um sensor químico é um dispositivo que transforma a informação química em função da concentração de um componente específico da amostra em análise, num sinal analiticamente útil [1].

O sensor executa duas funções: a) reconhecimento, em que é essencial a interação seletiva com o analito, o que garante o seu reconhecimento no sistema mesmo na presença de outras espécies com estrutura e propriedades similares. A subunidade do sensor responsável por essa função é chamada de recetor; b) transdução, é realizada por um transdutor cuja função é converter o reconhecimento numa resposta que possa ser medida [4]. Após este processo, ocorre o passo final, que consiste no processamento do sinal (Figura 1).

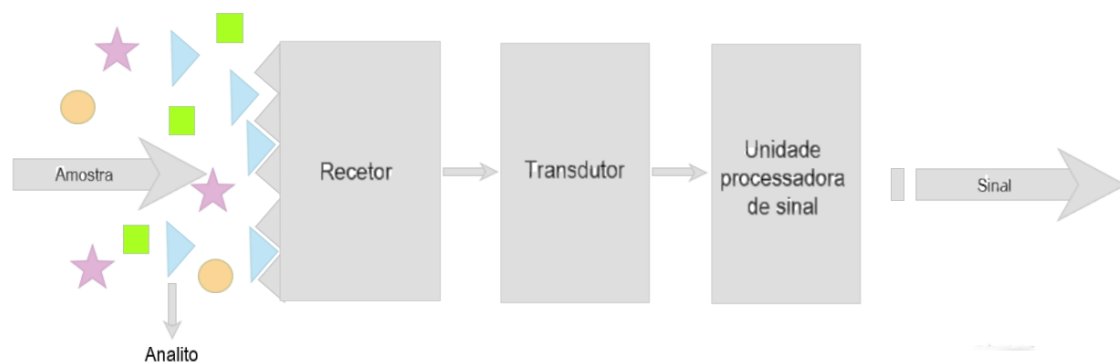


Figura 1 - Esquema da estrutura de um sensor

Existem diferentes sensores químicos podendo ser categorizados de acordo com os tipos de transdutores. Como resumido na Tabela 1, existem vários mecanismos de transdução que podem ser usados: eletroquímico, elétrico, ótico, térmico e piezoelétrico, entre outros [5]. Através do processamento de sinal, esta interação é convertida em valores que se relacionam com a concentração / atividade do analito na proximidade do dispositivo.

Tabela 1 - Principais sistemas de transdução em sensores químicos e as suas respetivas técnicas de medição. Adaptado da referência [3].

Sistema de transdução	Técnicas de medição
Eletroquímico	Potenciometria / Amperometria
Elétrico	Conductimetria
Ótico	Visível/ Fluorescência/ Refratometria/ etc.
Térmico	Calorimetria
Piezoelétrico	Ondas acústicas de superfície

De entre os diferentes tipos de sensores, os sensores óticos e os eletroquímicos são os mais populares [1, 2, 6, 7].

Sensores óticos

De um modo simples, pode-se dizer que um sensor ótico permite determinar através de alterações óticas a presença de um analito (Figura 2).

Um sensor ótico é um dispositivo que traduz alterações provocadas nos feixes de luz, seja intensidade, refração, etc. em sinais eletrónicos. Um dispositivo destes consiste em quatro componentes principais: a) o elemento de reconhecimento, onde ocorre a interação específica e a identificação do analito; b) o elemento transdutor que converte o processo de reconhecimento em um sinal ótico mensurável; c) um dispositivo ótico que é constituído por pelo menos uma fonte de luz e finalmente d) um detetor, que deteta e converte a mudança de propriedades óticas numa unidade de leitura. As propriedades óticas podem ser absorvância, refletância, luminescência, polarização de luz, efeito Raman e outras.

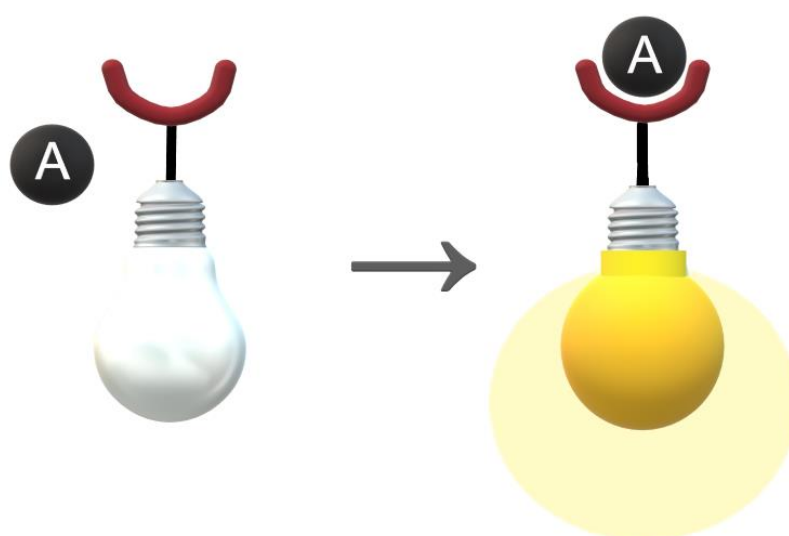


Figura 2 - Esquema ilustrativo interação entre o analito e o sensor

Idealmente, um sensor fornece sensibilidade adequada, alta seletividade em relação à espécie de interesse, uma saída de sinal que se relaciona à quantidade de analito e tempo de resposta rápido. Um sensor possui boas características quando é robusto, simples, económico em termos de fabricação e apresenta portabilidade. Os sensores já existentes têm limitações de estabilidade a longo prazo, interferência de outras espécies além de baixos limites de deteção. Por estas razões, a área da deteção ótica ainda é alvo de crescente investigação o que é refletido por um aumento contínuo de publicações e revisões [1, 2, 8].

Este tipo de sensores são uma ferramenta analítica atraente, sempre que a monitorização contínua e a informação em tempo real são de especial interesse, pelo

que se tornam atrativos para diversas aplicações em diferentes áreas, tais como monitorização ambiental, controlo de processos, etc.

No que diz respeito à seletividade é essencial ter em conta que é impossível atingir a seletividade absoluta do sensor, ou seja, responder apenas à presença de um analito. Deste modo, a seletividade deve sempre avaliada de acordo com o meio de análise da sua aplicação final. É necessário ter em consideração a existência de diversas espécies que podem ser potenciais interferentes em relação ao analito pretendido, pelo que se procura reduzir este fator.

O desenvolvimento de sensores óticos nos últimos anos está relacionado com dois dos avanços científicos mais importantes: o laser e as modernas fibras óticas de baixo custo. Recentemente, as fibras óticas (Figura 3) tornaram-se uma parte importante da tecnologia de sensores.

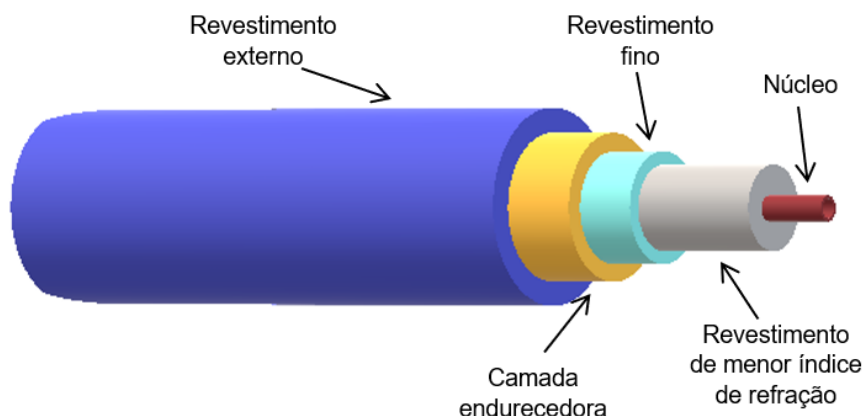


Figura 3 - Esquema da estrutura da fibra ótica com designação dos seus componentes

As fibras óticas transmitem luz com base no princípio da reflexão interna total (TIR). A fibra ótica consiste num núcleo transparente revestido por um material transparente com um menor índice de refração. A luz é mantida, deste modo no núcleo pela reflexão interna total. Isso faz com que a fibra atue como um guia. As fibras que suportam diversos caminhos de propagação ou modos transversais são chamadas de fibras multimodo (MMF), no caso de só suportarem um modo único são chamadas fibras de modo único (SMF) (Figura 4). As fibras multimodo geralmente têm um diâmetro de núcleo maior e são usadas para comunicação de curta distância e para aplicações em que uma alta potência deve ser transmitida [2, 9].

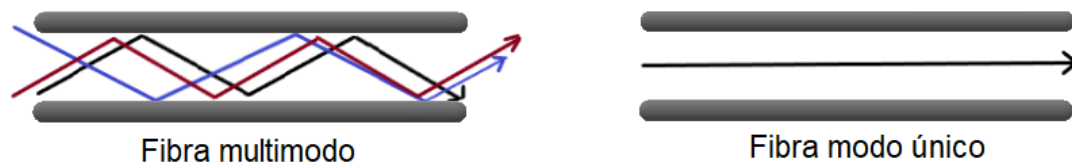


Figura 4 - Tipos de fibra ótica

Nos sensores óticos que têm por base a utilização de fibra ótica, a luz é guiada por uma fibra diretamente para a amostra, a fim de observar as propriedades espectrais do analito. Podem ser utilizados em combinação com diferentes tipos de técnicas espectroscópicas: absorção, fluorescência, fosforescência, ressonância plasmónica de superfície (SPR), etc.

As fibras óticas possuem uma vantagem em relação a fios metálicos, uma vez que estas possuem a capacidade de transmitir o sinal por toda a fibra com menos perda e também são imunes à interferência eletromagnética.

Os sensores óticos baseados no uso de fibra ótica podem ser classificados em duas categorias diferentes: sensores intrínsecos e sensores extrínsecos. No caso dos sensores extrínsecos a luz sofre alteração fora da fibra, numa cavidade de medição, depois regressa até ao detetor por meio da fibra de retorno. Em contraste, nos sensores intrínsecos o feixe de luz não sai da fibra ótica, mas é alterado ainda no seu interior (Figura 5). Nos sensores intrínsecos o elemento de interação com a luz é a própria fibra ótica, em que o analito / parâmetro a analisar atua sobre um elemento de interação que é colocado sobre a própria fibra ótica e altera algumas propriedades físicas da fibra. Essas alterações na fibra produzem uma alteração nas propriedades da luz que atravessa a fibra, sem nunca sair desta, tal como a intensidade, polarização, comprimento de onda etc. [9]

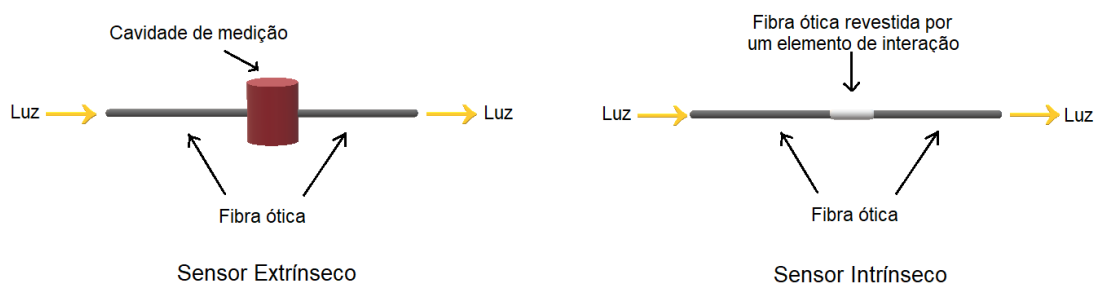


Figura 5 - Sensores extrínsecos vs sensores intrínsecos

1.1. Sensores baseados em membranas

Num sensor de fibra ótica extrínseca, a fibra é simplesmente usada para transportar luz de um dispositivo ótico externo onde ocorre o reconhecimento. Nesses casos, a fibra age apenas como um meio de levar a luz para o local de detecção. Sendo que nestes sensores, é de especial interesse o dispositivo ótico usado. Estes sensores são muitas vezes constituídos por membranas / filmes poliméricos, que servem de suporte para imobilizar a espécie de reconhecimento.

1.1.1. Membranas de biopolímeros de origem marinha

Os polímeros (que constituem a membrana) não atuam apenas como suportes sólidos nos quais os cromóforos são imobilizados, mas também podem fornecer seletividade de permeação para certas espécies, enquanto rejeitam outros. O material é imobilizado na extremidade final das fibras óticas dos sensores extrínsecos e interage com o analito que absorve a luz, permitindo uma melhor seletividade. A escolha do material polimérico tem um efeito determinante no desempenho do sensor. O tempo de resposta, por exemplo, depende principalmente dos coeficientes de difusão dos iões no polímero [14]. Nesta tese procurou-se a obtenção de um sensor com base numa membrana constituída por biopolímeros.

A utilização de biopolímeros, mais especificamente polissacarídeos biodegradáveis e biocompatíveis, tem-se tornado muito atrativa [10]. Devido à sua disponibilidade e baixo custo, o quitosano, sulfato de condroitina e fucoidano são considerados materiais adsorventes compatíveis com a economia circular, uma vez que podem ser extraídos de desperdícios de origem marinha [11].

Com o crescimento da população, existe um aumento na produção de resíduos, uma vez que grande parte dos subprodutos gerados pelos alimentos contemporâneos continua subutilizada, e estes contêm, muitas vezes, substâncias de alto valor que podem ser reaproveitados. Um problema crucial enfrentado pelas indústrias e pela sociedade durante o processamento de alimentos é o descarte de resíduos alimentares.

Dos recursos marinhos que são desperdiçados é possível retirar diversos biopolímeros, de entre os quais: sulfato de condroitina – proveniente da cartilagem de tubarão e outros peixes; fucoidano – oriundo de algas marinhas; quitosano – extraído principalmente das carapaças de crustáceos. Foi estimado que cerca de 10^{11} toneladas de quitina, precursor de quitosano, são produzidas anualmente por organismos vivos no oceano [12].

Em 2016, a captura mundial de organismos marinhos, assim como a aquacultura, ascendeu os 171 milhões de toneladas. De todos estes organismos, cerca de 27 % do peso total é corresponde a subprodutos e resíduos que incluem frações de animais (esqueletos, cabeças, vísceras), bem como ainda desperdícios devido ao tamanho ou qualidade sem valor comercial [13]. Como consequência deste tipo de indústria, a produção desses resíduos está localizada em áreas costeiras com o correspondente problema associado à poluição ambiental gerada por uma gestão ineficiente de resíduos. Para que haja uma maior eficiência da exploração destes organismos marinhos é necessário aumentar a rentabilidade do pescado procurando recuperar todos os materiais presentes nestas espécies (polissacarídeos, proteínas, óleos, minerais) através do uso de tecnologias e métodos não prejudiciais para o ambiente e de baixo custo. Recentemente, métodos alternativos foram desenvolvidos para obter diferentes produtos e moléculas: enzimas, glicosaminoglicanos, quitina, gelatina, peptonas marinhas, etc., a partir de esqueletos, peles, vísceras, cabeças, etc. [14 - 17]. Tendo em conta o número de aplicações e o valor económico dos produtos finais, os glicosaminoglicanos e a quitina são dos compostos mais importantes e relevantes para valorizar os resíduos marinhos.

Quitosano

A quitina possui uma estrutura química de cadeia longa linear formada por unidades sucessivas de um amino monossacarídeo (N-acetilglucosamina). É o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza após a celulose, fazendo parte das paredes

celulares dos microrganismos, exoesqueleto de insetos e conchas de crustáceos [17]. Este biopolímero é extraído essencialmente de organismos marinhos, uma vez que a quitina é um constituinte da matriz orgânica dos exoesqueletos de artrópodes, como os crustáceos (caranguejos, lagostas e camarões) e do endosqueleto dos moluscos. As propriedades que tornam estes biopolímeros tão atrativos para várias aplicações são a sua atividade antimicrobiana, capacidade de formação de filme, alta adsorção, biodegradabilidade, biocompatibilidade e não-toxicidade [18].

O quitosano é um copolímero linear de glicosamina e N-acetilglicosamina com ligações β -1,4 glicosídicas. O quitosano é produzido pela N-desacetilação alcalina da quitina, quando a desacetilação se dá de modo completo obtém a estrutura representada na Figura 6. Possui uma estrutura molecular semelhante à da celulose. Os resíduos pesqueiros, como camarão, lagosta e caranguejo, especialmente em países asiáticos, tornaram-se uma das opções preferenciais para a produção de quitosano, a partir da extração da quitina, uma vez que estes resíduos podem ser obtidos gratuitamente nas indústrias locais de pesca e em abundância.

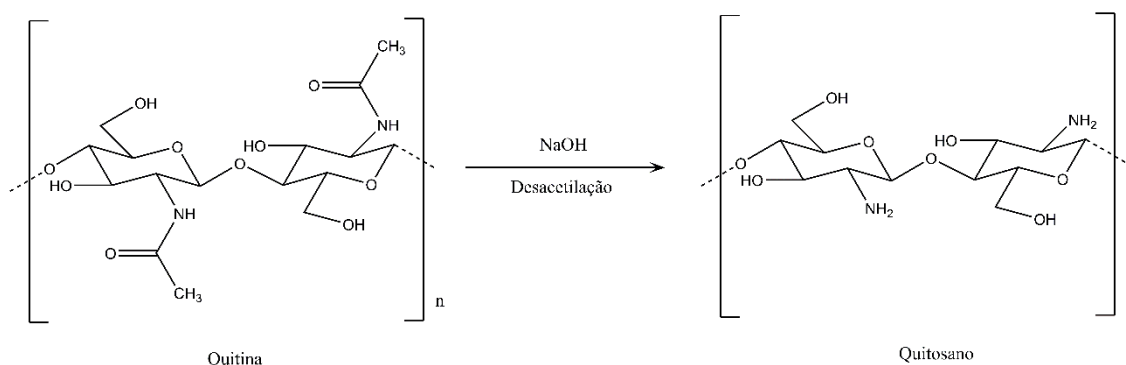


Figura 6 - Desacetilação da quitina

Este composto é insolúvel em solventes orgânicos ou água, mas é solúvel em soluções ácidas diluídas abaixo de pH 6,0, devido à presença de grupos amino livres com um valor de pKa de 6,3 [19].

O quitosano possui uma capacidade de formar filmes facilmente, juntamente com excelentes propriedades mecânicas e estabilidade térmica, o que o torna muito relevante na preparação de membranas [20].

Glicosaminoglicanos (GAGs)

Por definição, os glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos constituídos por uma unidade dissacarídica repetida sem cadeias ramificadas. Um dos monossacarídeos é um amino-açúcar (N-acetilgalactosamina ou N-acetilglucosamina) e o outro é um ácido urónico, estando presentes em todas as superfícies de células animais e na matriz extracelular [17].

Tradicionalmente, a produção de GAGs é obtida a partir de cartilagem de mamíferos, recuperada essencialmente de desperdícios de matadouros. No entanto, tem vindo a crescer a exploração de microorganismos e organismos marinhos como fonte desses compostos. Organismos marinhos como lulas, moluscos, invertebrados e principalmente o material cartilaginoso de peixes, como o tubarão, salmão, raia, etc., são potenciais fontes de GAGs. A cartilagem é um tecido formado por uma matriz de colagénio associada a proteoglicanos, macromoléculas com uma proteína nuclear à qual os GAGs, como sulfato de condroitina (CS), sulfato de queratano, sulfato de dermatano e sulfato de heparano são covalentemente ligados por meio de um trissacárido ligado a um resíduo de serina (Figura 7). O ácido hialurónico (HA) é o único GAG não-sulfatado e não está covalentemente ligado à proteína em qualquer tecido. O CS e HA são os GAGs mais valorizados no mercado devido à sua abundância.

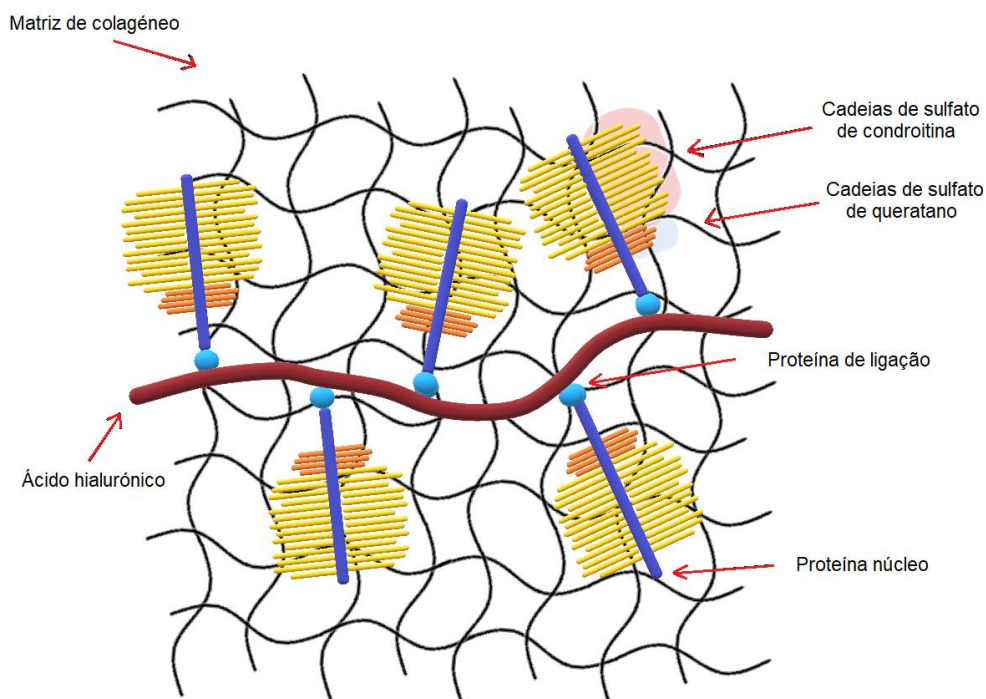


Figura 7 - Esquema da constituição da cartilagem

O sulfato de condroitina é formado por unidades repetidas de um dissacárido composto por ácido glucurônico (GlcA) e N-acetilgalactosamina (GalNAc) ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow3)$ e com grupos sulfato que podem ocupar diferentes posições de carbono, ou até mesmo não conter sulfato (CS sem sulfato é CS-O). A classificação e o tipo de CS é dependente da colocação do grupo sulfato: carbono 4 do GalNAc - CS-A, carbono 6 de GalNAc - CS-C, em ambos os carbonos 4 e 6 de GalNAc - CS-E, posições 6 de GalNAc e 2 de GlcA - CS-D e 4 de GalNAc / 2 de GlcA (CS-B) (Figura 8) [17, 21]. O sulfato de condroitina é essencial em diversos processos biológicos, como a elasticidade da cartilagem articular, hemostasia e inflamação, regulação do desenvolvimento celular, adesão celular, proliferação, entre outros [17]. Devido à sua abundância e ausência de toxicidade, o número de aplicações tem aumentado, pois este biopolímero apresenta uma alta biocompatibilidade com o organismo humano, e biodegradabilidade, dois fatores importantes a ter em conta na química moderna. A presença de grupos sulfato e carboxilato tornam este polissacarídeo atrativo para aplicações com cátions metálicos, devido à carga negativa destes grupos que facilmente interage com cátions metálicos [22].

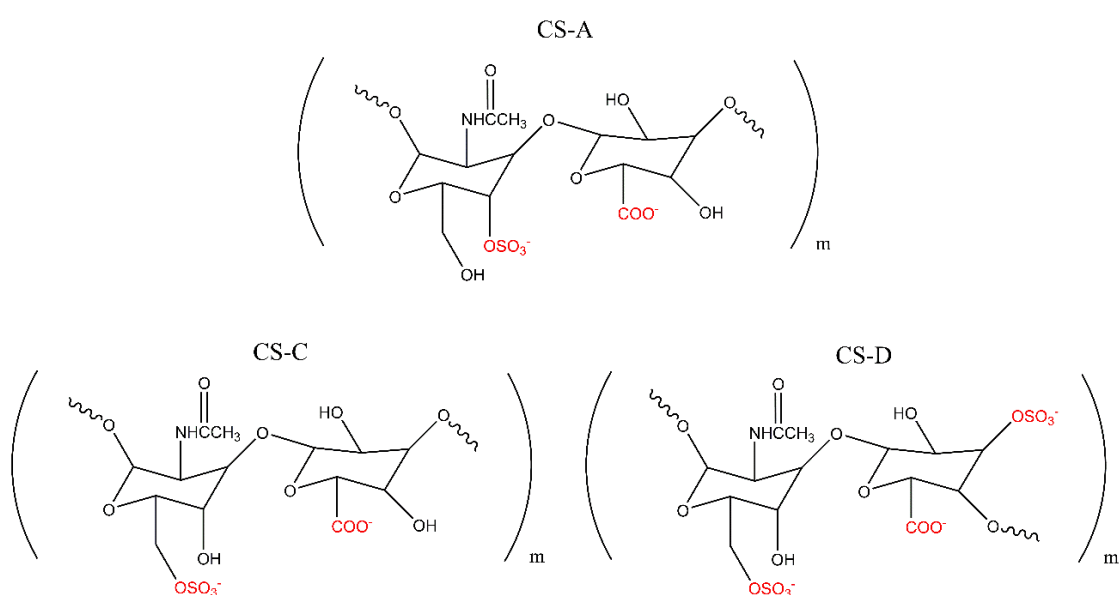


Figura 8 - Estrutura química de diferentes tipos de sulfato de condroitina

Fucoidano

O fucoidano (Fd) é um polissacarídeo aniônico sulfatado extraído de algas marinhas castanhas, tendo sido isolado pela primeira vez por Kylin em 1913 [23]. O fucoidano encontra-se sob a forma de uma solução viscosa em algas e previne a desidratação da alga.

A estrutura do fucoidano difere com a espécie de alga, especialmente entre diferentes algas castanhas. Em geral, é constituído principalmente por um núcleo L-fucose, sendo o monómero que se repete em maior número, possuindo ligações com pontes 1,4-O entre monómeros. Outro fator relevante deste polissacarídeo é a presença de grupos sulfato, que tal como ocorre com o sulfato de condroitina, permite que haja interação com cátions metálicos. Além da L-fucose, contém galactose, xilose ou ácido urónico [24]. A Figura 9 mostra a estrutura química típica do fucoidano.

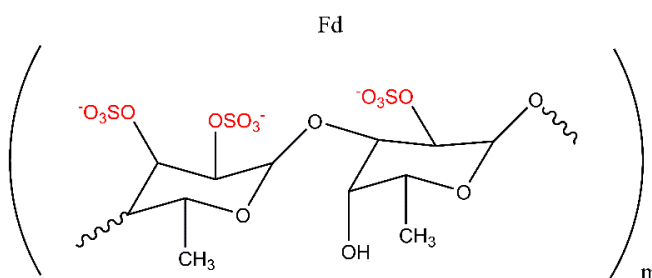


Figura 9 - Estrutura química mais comum do fucoidano

As massas moleculares das frações de fucoidano obtidos de várias espécies de algas variam entre 10 e 788 kDa, dependendo do tamanho da cadeia. Outra variável entre espécies de algas é o teor de sulfato nas frações de fucoidano, que por exemplo variou entre 7,6 e 10,8 %, segundo um estudo realizado em diversas algas [25].

Este polissacarídeo apresenta um aspeto de pó acastanhado, que se dispersa facilmente em água, devido à alta constante dielétrica da água, pelo que os grupos carregados são solvatados. Se solventes orgânicos, por exemplo o etanol, estiverem presentes, devido à sua menor constante dielétrica, o sulfato e os iões positivos podem formar ligações iónicas, o que resulta na sua precipitação [24].

Outros componentes

Por vezes, para obter membranas com características pretendidas é necessário a adição de diversos componentes. Dois componentes muito importantes para a obtenção de uma membrana com integridade e maleabilidade são os agentes reticulantes e plastificantes.

O glutaraldeído é uma espécie muito conhecida por funcionar como agente reticulante de cadeias de quitosano. Na Figura 10 está proposto um mecanismo de reticulação das cadeias de quitosano com o glutaraldeído, em que se verifica que a ligação do reticulante ao biopolímero se realiza sacrificando os grupos amina deste último [26].

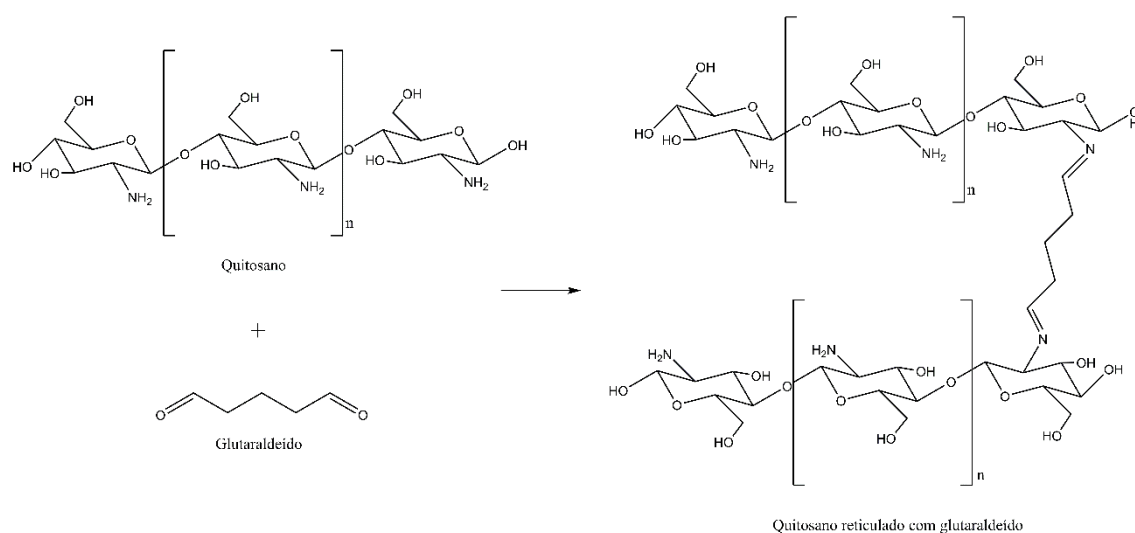


Figura 10 - Esquema proposto da reticulação entre quitosano e glutaraldeído. O glutaraldeído liga-se através do grupo amina do quitosano, com libertação de uma água na reação

A sua utilização provoca alterações nas propriedades, nomeadamente na absorção de água, permeabilidade a iões e nas propriedades mecânicas, tendo sido já reportada este tipo de alterações em membranas [27].

A maleabilidade da membrana pode sofrer alterações, devido à reticulação, uma vez que a estrutura fica mais estática devido às ligações químicas criadas, deste modo, por vezes, recorre-se a um agente plastificante para melhorar este parâmetro.

O glicerol é conhecido por funcionar como agente plastificante perante biopolímeros [28 - 30]. A sua presença no meio das cadeias provoca um decréscimo nas atrações intramoleculares das cadeias biopoliméricas adjacentes, melhorando a flexibilidade [28].

Sol-gel

Matrizes de sol-gel (Figura 11) têm ganho interesse como matrizes para materiais de sensores óticos devido à sua transparência ótica, estabilidade mecânica, serem pouco reativos e boa flexibilidade [31]. Assim, a técnica sol-gel possui uma elevada aplicabilidade na área de materiais com interesse na detecção química de analitos, tais como iões metálicos. As vantagens da tecnologia sol-gel são a sua simplicidade e versatilidade, bem como permitir a obtenção de filmes finos e flexíveis, sendo atrativos no mundo dos sensores devido à sua transparência [32, 33].

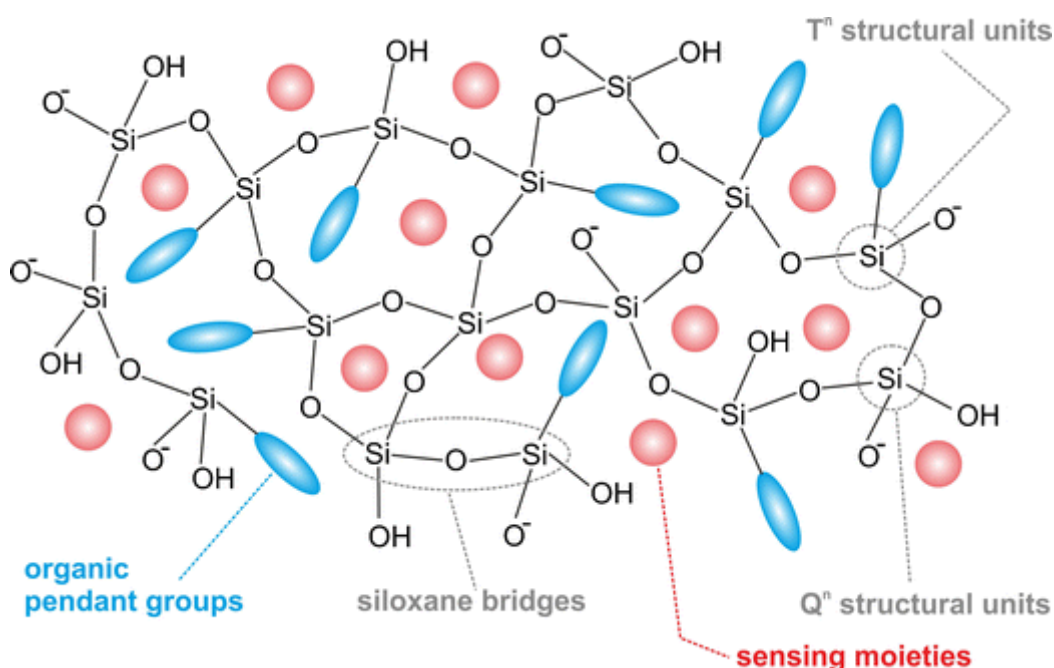


Figura 11 - Representação esquemática de rede sol-gel, com representação das pontes de siloxano, e unidades estruturais T^n , onde n representa o número de ligações com grupos orgânicos na formação do organossilano e Q^n , onde n representa o número de pontes de siloxano suportadas pelo átomo de silício [31]

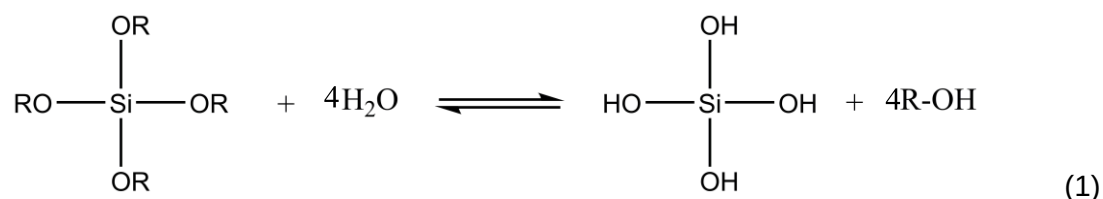
O processo sol-gel pode ser usado para a síntese a baixa temperatura de filmes sólidos finos, pós ultrafinos, materiais porosos de alta área superficial, entre outros. A técnica sol-gel envolve uma reação complexa, especialmente quando diferentes materiais são adicionados à matriz.

O termo *sol* refere-se a uma dispersão de partículas coloidais de uma fase num meio líquido. As partículas num *sol*, por definição, são coloidais, ou seja, à temperatura ambiente, elas permanecem dispersas, essencialmente devido ao movimento browniano. São partículas, geralmente, com dimensões menores do que 1000 nm [34]. Ao contrário de uma solução, um *sol*, sendo uma dispersão, é termodinamicamente

instável. O termo *gel* é definido aqui como um material consistindo de uma rede tridimensional de uma fase sólida entrelaçada com uma fase líquida contínua imobilizada.

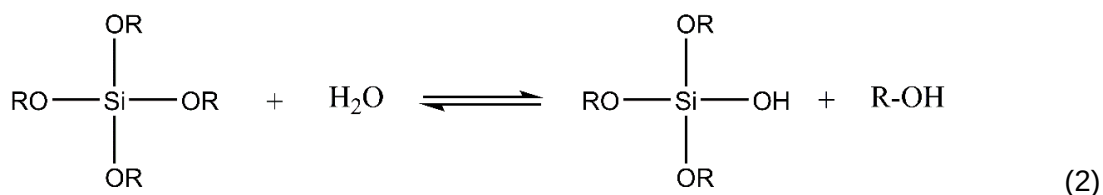
A base química para o processo polimérico sol-gel é semelhante ao conhecido processo de polimerização. As moléculas de alcoxissilano – $\text{Si}(\text{OR})_4$ existem como monómeros, dependendo dos alcóxidos específicos usados, do solvente e de outros fatores. A polimerização dessas espécies ocorre via hidrólise da fração $\text{Si}-\text{OR}$ e seguida reação de policondensação dos grupos $\text{Si}-\text{OH}$ resultantes da hidrólise [35]. A água é geralmente adicionada, no entanto, também pode ser gerada *in situ* por reações de condensação tais como a formação de ésteres. Diferentes ácidos ou bases são usados como catalisadores destas reações. A viscosidade inicial do *sol* derivado de precursores poliméricos é bastante baixa e em muitos casos é semelhante à da água. Se as reações de policondensação ocorrerem de forma significativa, o *sol* original forma um *gel* [35, 36].

A reação de alcoxissilanos com água é conhecida como reação de hidrólise (Eq 1).

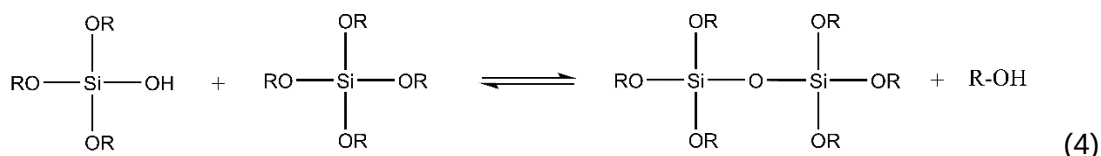
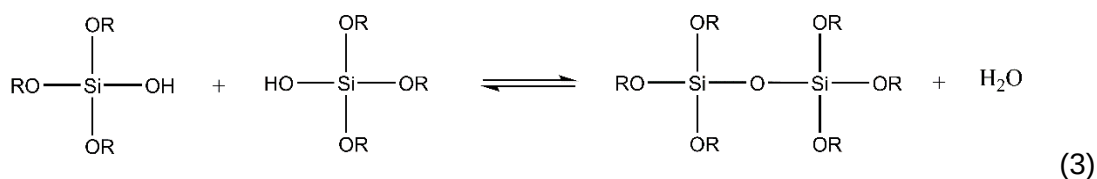


R – corresponde a uma cadeia alquílica.

A hidrólise pode ser total, isto é, todos os grupos alcóxilo são substituídos por grupos hidróxilo, ou pode ocorrer hidrólise parcial dependendo da concentração relativa de água e outras condições. A hidrólise parcial pode ser representada como na Eq 2.



O passo seguinte corresponde a reações de condensação (Eq. 3 e 4). A Eq. 3 corresponde à reação de condensação da água, enquanto que a Eq. 4 corresponde à condensação do álcool.



Os produtos das reações de condensação podem ser álcool, água ou ambos, dependendo do alcóxido utilizado. Assim, as ligações (Si-O-Si) podem formar-se durante a condensação, que ocorre utilizando precursores alcóxido. Uma característica importante dessas reações é que elas podem ocorrer em baixas temperaturas, isto é, abaixo dos 100 °C, e geralmente até se realiza à temperatura ambiente.

1.1.2. Impressão molecular

Existem limitações no que diz respeito à detecção ótica de iões. Apesar da disponibilidade de biopolímeros seletivos, muitos indicadores óticos reagem com mais do que um ião metálico, pelo que a seletividade é muitas vezes aumentada pelo ajuste de pH, algo que acontece devido a muitos indicadores de catiões metálicos também se combinarem com o ião hidrogénio. O pH deve ser ajustado de modo a aplicar um fator de correção apropriado. No entanto, uma técnica que pode melhorar esta seletividade é a impressão molecular.

A impressão molecular pode ser definida como um método de indução de propriedades de reconhecimento molecular, ou seja, é a criação de um recetor artificial com uma predeterminada seletividade para um dado analito [37]. Numa matriz polimérica isto ocorre devido à formação da estrutura tridimensional do polímero acontecer na presença de um *template*, pelo que a estrutura final se desenvolve em torno do *template*. O processo inicia-se, então, através da ligação ou interação de monómeros funcionais com o *template*. Após esta etapa ocorre a polimerização dos monómeros, formando-se uma matriz polimérica com o *template*, onde ocorre o ajuste dos grupos funcionais que melhor interagem com este, formando cavidades com tamanho e forma complementares à molécula *template*. Os monómeros escolhidos para formar a rede tridimensional são adequados para interagir com a molécula alvo, processo que pode ser realizado através de ligações covalentes ou interações não-

covalentes. Posteriormente, o *template* é removido por um processo de extração/lavagens. Como resultado, temos um polímero poroso com sítios de impressão adaptados à forma, tamanho e por vezes carga da molécula que funciona como *template* (Figura 12). Este reconhecimento pode ser visto como uma ligação preferencial de uma molécula a um recetor, com elevada seletividade em relação a moléculas análogas a nível estrutural. Deste modo, a polaridade é importante para a escolha dos materiais, porque a polaridade inadequada da superfície pode causar a não-interação ou apenas uma ligação fraca com a molécula alvo [38].

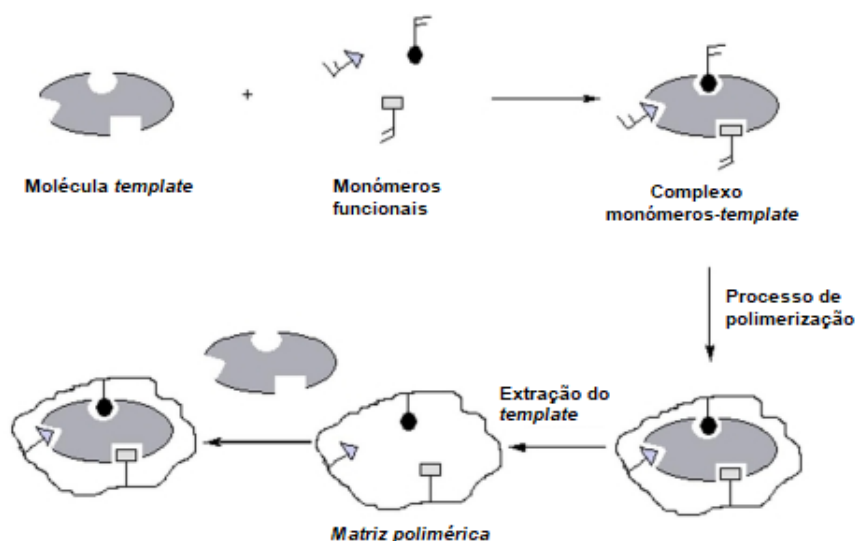


Figura 12 - Esquema de impressão molecular de polímeros, passo inicial da interação dos monómeros com o template, seguida da polimerização dos monómeros, por fim remoção do template, criando um local de reconhecimento.
Adaptado da referência [36] – livre para reprodução e adaptação

Nesta tese não foi utilizado o método tradicional de polimerização, uma vez que se utilizaram cadeias biopoliméricas para a síntese, em vez de monómeros. O uso de longas cadeias biopoliméricas permite a criação de redes tridimensionais com diferentes configurações, tais como filmes finos, materiais porosos e estruturas densas, que podem ser aplicadas na adsorção, catálise e sensores, pelo que são extremamente atrativas para aplicação em processos de impressão molecular. A criação destes materiais molecularmente impressos (MIMs) é realizada através da síntese do material com o analito de interesse no meio de síntese. Deste modo as cadeias entrelaçam-se entre si, ajustando-se e redireccionando os seus grupos funcionais de modo a criar locais de reconhecimento em torno do analito (Figura 13).

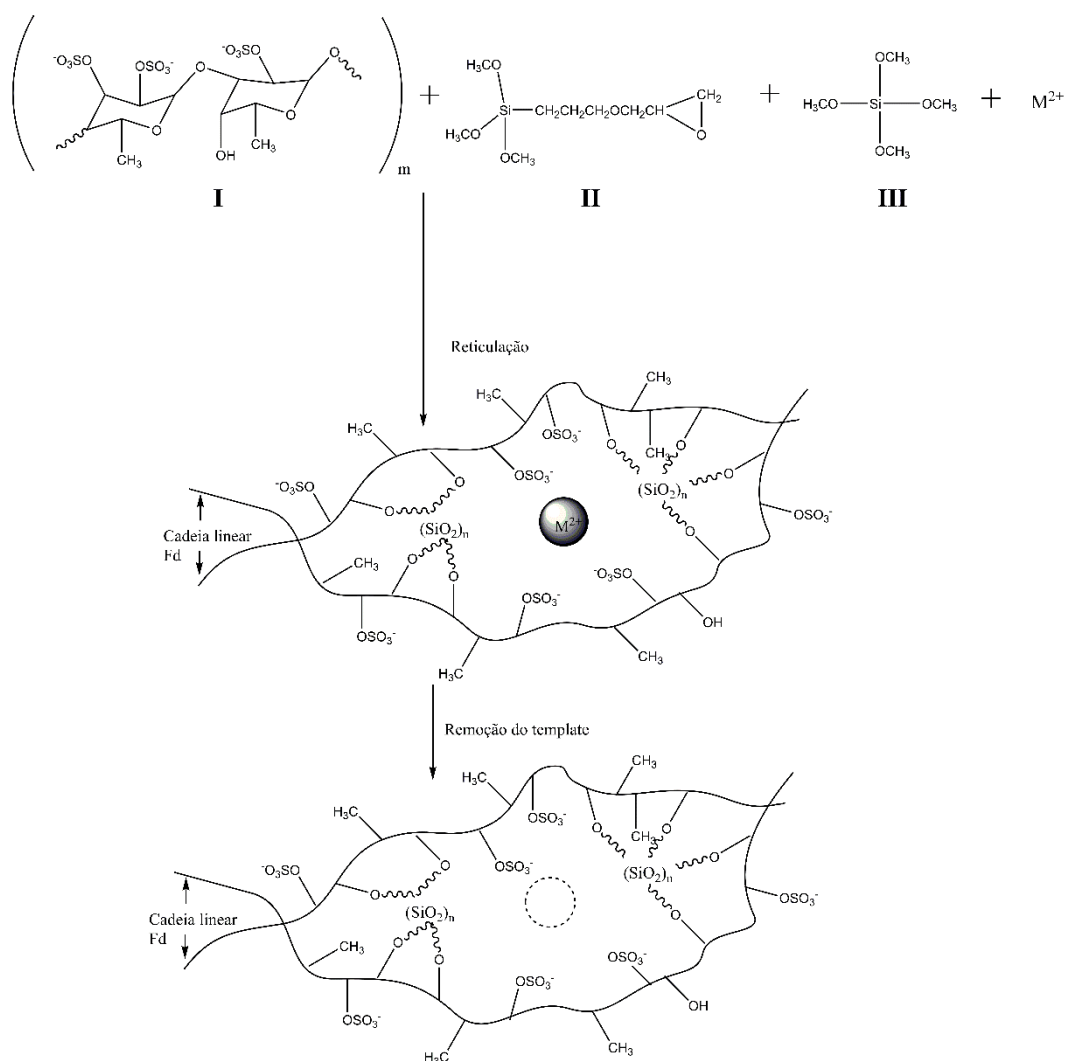


Figura 13 - Esquema exemplo de impressão molecular de polissacarídeos, nomeadamente fucoidano. Realizada a reticulação entre as cadeias através do GPTMS - (3-(3-glicidiloxipropil) trimetoxissilano, que realiza a ponte entre as cadeias de fucoidano e a sílica, através dos grupos OH destes compostos. I – Fucoidano, II – GPTMS, III - TMOS. Adaptado da referência [39]

No que se relaciona com sensores, os polímeros molecularmente impressos (MIPs) ou MIMs são materiais sintéticos com a funcionalidade de reconhecimento em sensores devido à sua maior estabilidade térmica e reutilização em comparação com os recetores biológicos [40]. A molécula alvo ao ligar-se a estes materiais poliméricos podendo provocar variações nos parâmetros físicos, absorvância ou índice de refração, dependendo da forma, carga e funcionalidade da molécula alvo [41].

Os MIMs têm a capacidade de resistir a variações de pH, ao ambiente orgânico e à força iónica. Como tal, o uso destes materiais na tecnologia de sensores é muito benéfico.

1.2. Sensores óticos de catiões metálicos

No passado, até há cerca de umas décadas atrás, o Homem acreditava que a natureza poderia lidar com substâncias perigosas, pelo que havia uma elevada despreocupação com a forma de como se descartava este tipo de substâncias. Embora atualmente haja uma maior preocupação com o ambiente, a poluição ainda é um problema muito presente. Os processos industriais são grandes responsáveis pela poluição na atmosfera e no ecossistema aquático [42]. Os metais pesados representam um grupo dessas substâncias perigosas, embora nem todos sejam considerados prejudiciais aos seres humanos. A relevância da determinação destes compostos em quantidades vestigiais tornou-se cada vez mais emergente, pelo que os sensores óticos de catiões são uma possível resposta para uma determinação rápida no local deste tipo de compostos em concentrações baixas.

Metais pesados no meio ambiente

Metais pesados, por definição, são metais com massas atômicas entre 63,5 e 200,6 g.mol⁻¹ e uma densidade superior a 5 g.cm⁻³ [43, 44]. Estes metais encontram-se presentes em diversos meios e sendo não-biodegradáveis levam a um maior risco para a saúde humana e meio ambiente.

Os metais, encontrados essencialmente como catiões deterioram a saúde humana através da sua acumulação na biosfera e devido à sua presença na cadeia alimentar [45]. A sua toxicidade é causada muitas vezes devido à formação de ligações do metal com o grupo tiol de proteínas, o que causa a inibição destas [46]. Alguns metais pesados, tais como o ferro, cobalto, zinco, cobre, manganês, entre outros, são essenciais para organismos vivos em pequenas quantidades, uma vez que é na presença destes elementos, juntamente com aminoácidos e ácidos gordos e vitaminas, que processos bioquímicos normais, como respiração, biossíntese e metabolismo se realizam [43, 44], mas a sua presença em concentrações mais altas leva a efeitos tóxicos. Metais pesados como cádmio, chumbo, arsénio, crómio e mercúrio são consideradas espécies com elevada toxicidade mesmo em concentrações baixas [44].

Os metais pesados foram introduzidos em diferentes meios devido a atividades humanas, o que influenciou e modificou os ciclos naturais. Como os metais pesados são relativamente abundantes na crosta terrestres, são utilizados em diversas atividades e processos. Estas atividades remontam há mais de 4000 anos com a mineração de metais. No entanto, a poluição sem precedentes surgiu com a industrialização,

nomeadamente a combustão de combustíveis fósseis, que introduz uma grande quantidade de metais pesados na atmosfera e no ambiente aquático, uma vez que o petróleo bruto, por exemplo, contém 3,4 ppm de mercúrio e a queima do carvão provoca a emissão mundial de $2,4 \times 10^4$ toneladas de chumbo por ano [47].

Existe uma grande tendência por parte dos metais pesados para a formação de complexos, especialmente com moléculas contendo nitrogénio, enxofre e oxigénio. Os efeitos toxicológicos podem ser explicados por essa interação. A formação destes complexos origina modificações na estrutura molecular de proteínas, quebra de pontes de hidrogénio ou até inibição de enzimas. A toxicidade crónica provocada por metais pesados, causada pela exposição repetida por longos períodos, leva a efeitos mutagénicos, carcinogénicos ou anomalias congénitas [44, 48].

Chumbo

O catião chumbo representa um contaminante grave no meio ambiente, pois pertence à classe de metais pesados que são tóxicos mesmo em quantidades vestigiais. A toxicidade do chumbo advém do seu ião ligar-se ao grupo tiol ($-SH$) em enzimas, causando a sua inibição, bem como este interferir com mecanismos metabólicos e homeostáticos, nomeadamente no que se refere a hormonas que influenciam o metabolismo do cálcio, pelo que prejudica os ossos [49]. O chumbo substitui o cálcio nos ossos e, portanto, provoca atrasos na reparação de fraturas, osteoporose, afeta os osteoblastos – células responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea -, etc. [50]. O chumbo também pode causar danos graves no cérebro, rins, fígado, sistema nervoso central, sistema cardiovascular, sistema imunológico ou até mesmo a morte [51]. Em pequena quantidade, pode causar diversos problemas, tais como, parto prematuro, dores musculares, anemia, dor de cabeça e ainda provocar a sensação de fadiga e irritabilidade. Devido ao seu perigoso efeito tóxico para humanos, vários métodos para determinar iões de chumbo foram desenvolvidos.

O chumbo, sob a forma de catião, representa um dos maiores riscos para a saúde pública [52]. A exposição a este composto pode dar-se por diversos meios, como pela inalação de ar contaminado, contacto com solo contaminado ou ingestão de água contaminada. A contaminação da água pode ocorrer de diversas maneiras. No caso da contaminação da água da torneira com chumbo, esta ocorre quando a água passa por canos mais antigos contendo chumbo, solda de chumbo ou ligas de chumbo. Sendo a

água um dos principais meios a que o ser humano está exposto, é de total interesse o controlo da quantidade de catiões deste metal presente nesta, pelo que diferentes agências determinaram o limite máximo permitido, de acordo com dados de toxicidade e estudos científicos. No entanto, de acordo com o Centro de Controle de Doenças dos EUA, "nenhum nível de chumbo no sangue é considerado seguro", pois o chumbo não tem papel biológico natural conhecido no corpo humano [53]. Na Tabela 2 estão presentes limites de chumbo impostos por algumas agências reguladoras relacionadas com a saúde e o ambiente. Não estão presentes, no entanto limites também importantes como nos alimentos, devido a estes variarem com cada tipo de alimento, o que torna a tabela extensa. No caso da comissão europeia os limites de chumbo em diferentes alimentos variam de 0,020 a 1,5 ppm [54].

Tabela 2 - Limites de Pb(II) em água potável e no ar para as respetivas agências.

Meio	Agência	Nível máximo de contaminante (MCL)	Referência
Água potável	World Health Organization – WHO	10 ppb	[55]
	European Commission	10 ppb	[56]
	EPA – Estados Unidos da América	15 ppb	[57]
	Health Canada	5 ppb	[58]
Ar	European Commission	0,5 $\mu\text{g.m}^{-3}$	[59]
	World Health Organization – WHO	1,5 $\mu\text{g.m}^{-3}$	[59]

Métodos convencionais de determinação de metais pesados vs sensores óticos

As preocupações ambientais e os efeitos na saúde associados mesmo a níveis muito baixos de chumbo traduzem-se numa necessidade de ferramentas de deteção e quantificação do chumbo numa gama de baixas concentrações. São essenciais métodos de deteção sensíveis, seletivos e simples.

A determinação de níveis vestigiais (ppm e ppb) de metais pesados tóxicos em matrizes complexas, mas mais especialmente em águas naturais (oceano, mar, rios), e

águas residuais, tornou-se muito importante, porque esses meios são vulneráveis a este tipo de poluentes [60].

Existem diversos métodos tradicionais para a análise qualitativa e quantitativa de chumbo em água subterrânea, superficial ou residual. A obtenção de limites de detecção e intervalos de detecção lineares dependem muito da matriz da amostra, instrumentação e condições de operação selecionadas. Dos métodos existentes, os aprovados pela EPA para detecção de chumbo incluem a espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) [59, 61] com um limite de detecção de 0,6 ppb, espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) [59, 62] com um limite de detecção de 42 ppb e espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite cujo limite é de 0,7 ppb [59, 63]. Existem outras técnicas para determinação tais como espectroscopia de fluorescência de raios X e métodos eletroquímicos. Estas técnicas exibem alta sensibilidade, seletividade e precisão, mas requerem instrumentação sofisticada, o que muitas vezes se traduz em aparelhos de dimensões grandes, o que torna estas técnicas inadequadas para uso fora do laboratório, requer ainda pessoal qualificado, e recolha de amostras, e por vezes um procedimento complexo de preparação de amostra, que são potenciais fontes de erro e, na maioria dos casos, são necessários longos períodos de medição [5].

A preservação do meio ambiente deve ser constantemente monitorizada. Para este propósito, é favorável a realização de análises rápidas, confiáveis e *in situ*. Os sensores óticos são uma boa alternativa aos métodos convencionais, correspondendo aos requisitos supramencionadas.

Para compreender o funcionamento de um sensor ótico para catiões metálicos pesados é necessário primeiro compreender a interação entre o catião e o cromóforo. Os catiões metálicos podem ser determinados utilizando reagentes complexantes, cuja cor difere do complexo formado possui cor ou intensidade diferente da espécie complexante e/ou catião metálico, uma vez que a reação de ligação com os iões é acompanhada com uma alteração na absorção ou fluorescência. O que ocorre com muitos indicadores de metais pesados é que estes sofrem uma mudança de cor, em termos espectroscópicos, ocorre o aparecimento de uma banda com o simultâneo desaparecimento de outra, enquanto noutros casos apenas haveria uma alteração na intensidade de uma única banda [4]. Isto ocorre devido a ambas as espécies indicadoras, complexadas ou não, absorverem luz no visível.

Muitas vezes, a espécie usada nos sensores são chamadas de cromoionóforos, pois incluem um centro de complexação que reconhece iões – parte do ionóforo - acoplado a um grupo cromogénico, que traduz a informação química através de alterações no sinal ótico. A seletividade do sensor é baseada na seletividade da formação do complexo ião-cromoionóforo. Os sensores óticos são obtidos pela imobilização destes cromoionóforos numa matriz permeável a iões [64].

1.2.1. Sensores óticos para o catião chumbo

Para o Pb(II) existem diferentes cromóforos complexantes. Na Tabela 3, encontram-se presentes alguns sensores para a deteção deste catião. Na literatura não existem muitos artigos sobre a determinação de chumbo através de sensores que operem na gama do visível.

Tabela 3 - Sensores óticos para deteção de chumbo (apenas na gama do visível)

Cromóforo	Intervalo de concentrações	Ref
Alaranjado de xilenol	0,62 – 6,2 ppm	[65]
Ditizona	0,062 – 2,07 ppm	[66]
Calix(4)areno	0,02 – 200 ppm	[67]
Ditizona	0,2 – 1,1 ppm	[32]
ácido 2-amino-ciclopenteno-1-ditiocarboxílico (ACDA)	0,21 – 10400 ppm	[68]

Dos artigos encontrados para sensores óticos de chumbo, os cromóforos foram aplicados em diferentes matrizes por diferentes métodos. No caso do artigo sobre a deteção ótica de chumbo utilizando o alaranjado de xilenol, este foi imobilizado numa resina de permuta aniónica, em que 2 g de resina eram imersas em 100 mL de uma solução de 1×10^{-3} mol.dm⁻³ de alaranjado de xilenol por um período de 3 h. O sinal obtido após contacto com soluções de catião chumbo era determinado pelo máximo da refletância a 560 nm. Neste caso foi estudado um intervalo de 0,62 a 6,2 ppm, sendo 0,62 ppm, também, o limite de deteção [65].

Outro cromóforo usado foi o calix(4)areno, tendo sido imobilizado em cloreto de polivinilo (PVC). A análise do espectro UV-Vis para material após contacto com diferentes concentrações de Pb(II) revela uma banda a 470 nm que diminui de intensidade com o

aumento da concentração do catião, sendo referida como a banda pertencente ao ligando livre, e uma banda a 495 nm que aumenta de intensidade, referida como pertencente ao complexo. Para este material, não foi apresentado limite de deteção pelos autores, apenas uma gama de concentrações estudadas entre 0,02 e 200 ppm. [67].

O ácido 2-amino-ciclopenteno-1-ditiocarboxílico (ACDA) foi outro cromóforo também estudado na literatura, em que foi imobilizado numa membrana de triacetilcelulose. O método utilizado foi a imersão da membrana numa solução de ACDA a $5 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ por 6 h. Foi realizada a análise por UV-Vis da membrana após contacto com Pb(II), medindo-se o máximo da absorvância a 423 nm [68]. Neste caso, foram obtidos limites de deteção de 0,14 ppm, com gama de leitura entre 0,21 e 10400 ppm.

Por fim, outro cromóforo encontrado, já muito utilizado para a complexação com Pb(II), foi a ditizona. Este cromóforo foi aplicado em duas matrizes diferentes. Num caso, foi realizada a imersão de 10 mg de Amberlite XAD-4 em 10 mL de uma solução saturada de ditizona em metanol, por 1 h, tendo sido analisados o máximo a 650 nm dos espectros de refletância após imersão nas soluções de catião chumbo. O intervalo estudado foi de 0,062 a 2,07 ppm, com um limite de deteção de 0,002 ppm [66]. No outro caso foi utilizada uma membrana de quitosano e sílica, que foi imersa por 6 h numa solução de $5 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ de ditizona. A membrana foi colocada em contacto com soluções de catião chumbo e foi em seguida analisada por espectroscopia de UV-Vis, tendo sido determinado o máximo de absorvância a 488 nm. O limite de deteção determinado foi de 0,11 ppm, tendo sido determinado um range de 0,2 a 1,1 ppm [32].

A 1,5-difeniltiocarbazona, mais conhecido como ditizona (Figura 14), apresenta uma importância na química analítica devido às suas reações colorimétricas com metais pesados vestigiais [69]. A ditizona foi inicialmente sintetizada e estudada por Emil Fischer em 1882 [70]. Este composto é solúvel em soluções alcalinas.

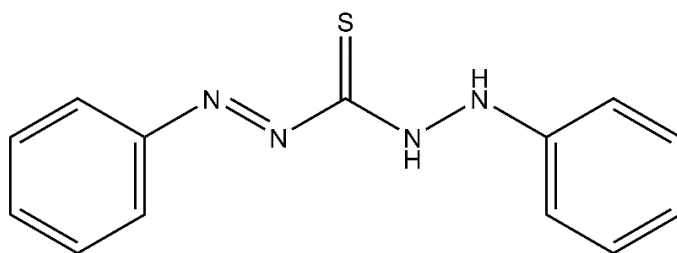


Figura 14 - Estrutura química da ditizona

A ditizona pode reagir com alguns cátions metálicos formando complexos intensamente corados (Figura 15). A absorção intensa na gama do visível é devida à transferência de carga entre o ligando e metal [71] [72].

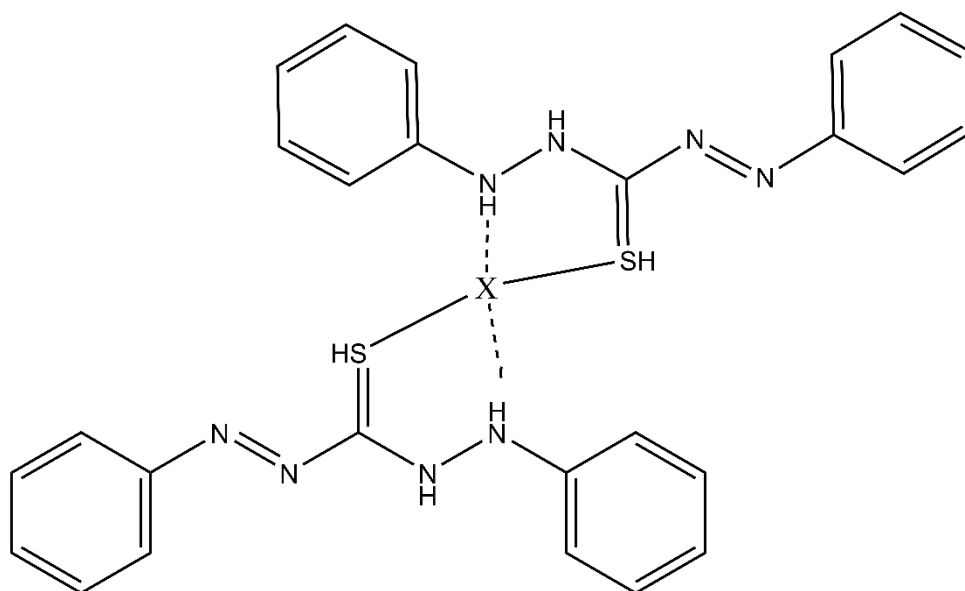


Figura 15 - Esquema de possível ligação entre ditizona e cátion metálico

Os biopolímeros escolhidos (quitosano, sulfato de condroitina e fucoidano) para formar a matriz da membrana apresentam, segundo a literatura, uma tendência natural para interagir com cátions de metais pesados, mais em específico o cátion chumbo. Na Tabela 4 estão presentes alguns exemplos das capacidades de retenção de chumbo que estes biopolímeros têm apresentado.

Tabela 4 - Capacidade de adsorção de Pb(II) (mg/g) de metais por materiais de quitosano, sulfato de condroitina e fucoidano.

Material	Capacidade de adsorção (mg/g)	Ref
Quitosano/ fibras de algodão	101,53	[73]
Quitosano/ magnetite	63,33	[74]
Quitosano/ celulose	26,31	[75]
Quitosano/ areia	12,32	[76]
Compósito de CS-Sílica	13 ± 2	[22]
Compósito de CS-Sílica MIM	20 ± 2	[77]
Compósito de CS-Sílica mesoporoso	54 – 61	[78]
Compósito de Fd-Sílica	24 ± 3	[22]
Compósito de Fd-Sílica MIM	30 ± 3	[38]
Compósito de Fd-Sílica mesoporoso	59 – 79	[78]

Estes polissacarídeos têm apresentado boas características no que se relaciona com a adsorção de metais pesados, mais em específico pelo Pb(II), pelo que são bons candidatos para a formulação da membrana base do sensor ótico de iões metálicos. Foram descritos como biopolímeros adequados para a remoção deste catião metálico [72-78] devido à presença do grupo funcional amina que confere propriedades quer de polieletrólito, quer quelantes ao quitosano [50] e devido à presença de grupos sulfato no caso do sulfato de condroitina e fucoidano.

Embora já haja na literatura matrizes de membranas para sensores óticos para o catião chumbo com quitosano [32,50], ainda existe muitas possibilidades a serem exploradas. No que se relaciona com a formação de membranas sensoras com matrizes de polissacarídeos sulfatos, mais em específico sulfato de condroitina e fucoidano, ainda não existe nada descrito na literatura, pelo que se torna algo promissor e vantajoso a nível científico, o estudo da sua incorporação nestas matrizes.

1.3. Objetivo da dissertação

O presente trabalho baseou-se na obtenção de membranas sintetizadas através dos biopolímeros de origem marinha, para aplicação como optossensores. Os biopolímeros escolhidos para a formulação da matriz, foram o quitosano, sulfato de condroitina e fucoidano. Ao utilizar estes biopolímeros pretende-se tirar vantagem da afinidade destes compostos pelo analito de interesse. Este trabalho procura melhorar ainda mais essa afinidade através da impressão molecular. Ao possuir uma matriz com impressão molecular numa membrana de um sensor ótico, permitimos que haja maior atração do analito de interesse para a membrana, bem como maior tempo de contacto deste com o cromóforo que irá produzir o sinal, permitindo assim, uma melhor sensibilidade. Para além destes benefícios, permite que a membrana sensora tenha uma melhor seletividade.

No que se refere a síntese de sensores com impressão molecular para a deteção de metais pesados ainda existe pouco avanço, tendo apenas sido relatado em alguns artigos, da pesquisa realizada dos poucos artigos existentes de sensores com impressão molecular, são com base na fluorescência [79-82], não foi encontrado nenhum que tivesse por base a região do espectro do visível.

Em relação à impressão molecular aplicada a membranas formadas por biopolímeros, apenas foi possível encontrar um artigo, no entanto sem aplicação para sensores [83].

Capítulo 2 - Técnicas instrumentais

Na atualidade, existem inúmeras técnicas já bem fundamentadas e estudadas, com sensibilidades e precisões que permitem retirar diversas conclusões a respeito dos materiais estudados. Diferentes técnicas fornecem diferentes informações sobre a caracterização do material.

Muitas das propriedades exibidas pelas membranas são devidas a interações na interface com o meio circundante. Como todas as interações em que o meio circundante pode conter uma mistura de água, iões, moléculas orgânicas e macromoléculas, as propriedades físicas e químicas desempenham um papel fundamental na sua operação. Assim, ao tentar entender como tais interações afetam a sua função é possível desenvolver novas membranas com propriedades aperfeiçoadas. Neste capítulo são descritas e discutidas uma série de técnicas instrumentais comumente usadas para caracterizar a membrana.

2.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com reflexão total atenuada (ATR)

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), particularmente com o módulo de refletância total atenuada (ATR), é uma das técnicas mais importantes disponíveis para estudar a composição da superfície da membrana e entender possíveis modificações químicas feitas nessas superfícies. [84].

Os instrumentos FTIR operam tipicamente no meio da faixa de infravermelho, com números de onda de aproximadamente 600 a 4000 cm^{-1} . Esta técnica explora o facto de as moléculas absorverem radiações que são características da sua estrutura. Estas absorções ocorrem a frequências que correspondem à frequência vibracional, sendo ativo no infravermelho se houver uma mudança no momento dipolar da molécula durante o decorrer da vibração [84].

A vibração de moléculas inteiras produz padrões de absorção complexos em altas frequências, o que muitas vezes é particular àquela espécie química e, portanto, é de grande utilidade na identificação de moléculas particulares [85]. Diferentes grupos funcionais possuem vibrações específicas de determinados números de onda.

O instrumento mais usado em laboratório é o espectrofotômetro de infravermelho com a técnica de transformada de Fourier (FTIR). A luz infravermelha é guiada através de um interferômetro e seguidamente através de uma amostra. Uma técnica de processamento de dados chamada Transformada de Fourier transforma estes dados em bruto (interferograma) no resultado desejado (o espectro da amostra) [86] (Figura 16 – esquema exemplo). Esta técnica melhora a velocidade de obtenção de espectro e a relação sinal-ruído. Uma outra vantagem deste método, é que não é destrutivo, pelo que a amostra pode sempre ser recuperada.

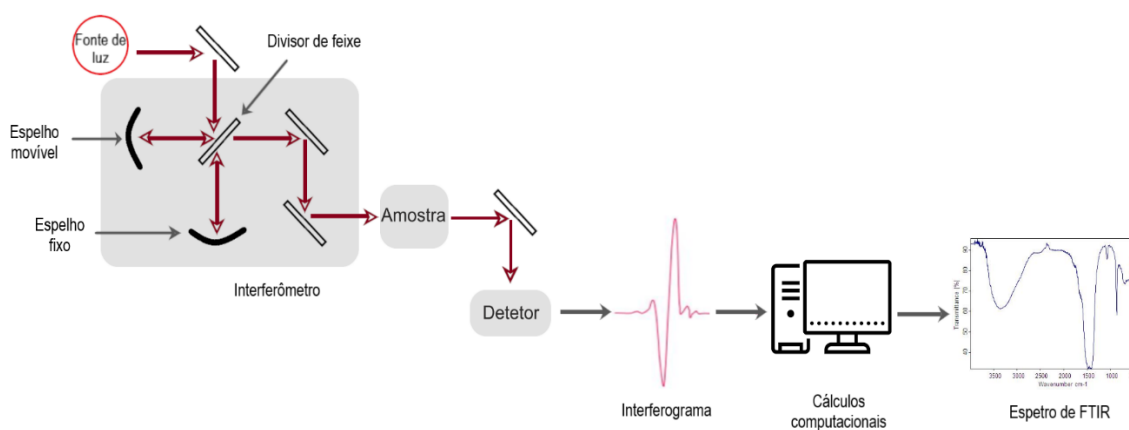


Figura 16 - Representação esquemática do funcionamento do FTIR

A grande maioria dos instrumentos FTIR enquadra-se em uma das quatro categorias: transmissão, refletância total atenuada (ATR), espectroscopia de refletância difusa (DRIFTS) e refletância especular / absorção de reflexos. As duas técnicas mais utilizadas para sólidos são DRIFTS e ATR, sendo que nesta tese o FTIR-ATR.

O FTIR-ATR é útil para examinar superfícies de amostras e, portanto, é de especial interesse para o estudo de superfícies de membranas. Durante a operação FTIR-ATR, um feixe de luz infravermelha é direcionado para um cristal de alto índice de refração, que pode ser tipicamente germânio, seleneto de zinco, diamante, entre outros, em contato direto com a amostra (Figura 17). Devido ao alto índice de reflexão, ocorrem múltiplas reflexões internas do feixe de infravermelho, o que cria uma onda evanescente, que interage com o material da amostra, quando o ângulo de incidência excede o ângulo crítico [87]. A absorção da onda evanescente pela amostra leva à diminuição da intensidade do feixe, antes de ser refletida de volta através do cristal e para o detetor.

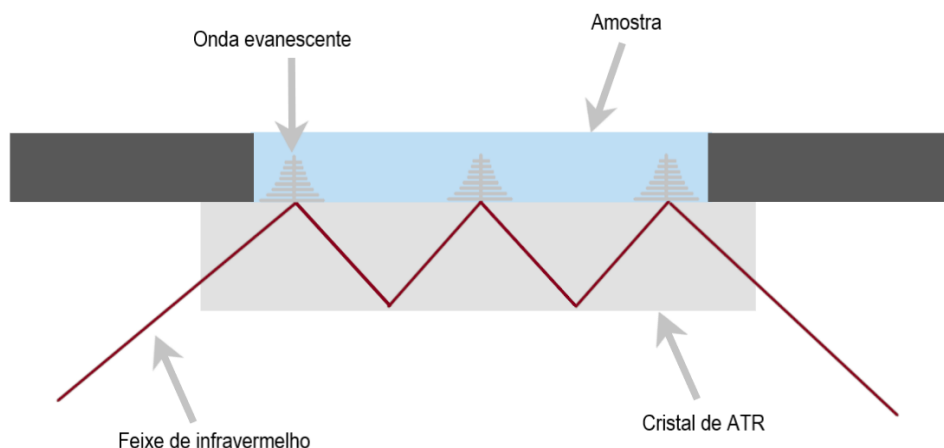


Figura 17 - Esquema de funcionamento de acessório ATR

2.2. Análise Termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria (TG) é um método de análise térmico no qual se mede continuamente a massa enquanto a temperatura de uma amostra é alterada ao longo do tempo. Esta técnica é muito popular na investigação de polímeros, em particular para estudar a estabilidade térmica de sistemas poliméricos sob condições de aplicação. Esta tecnologia fornece informações sobre fenómenos físicos, como transições de fase, absorção, adsorção e dessorção, bem como fenómenos químicos incluindo adsorção química, decomposição térmica, e as reações de gás-sólido. Um termograma pode ser usado para caracterização de materiais através da análise de padrões de decomposição característicos [88].

Um analisador termogravimétrico típico consiste numa balança de precisão com uma bandeja de amostra localizada dentro de um forno com uma temperatura de controlo programável. A temperatura é geralmente aumentada a taxa constante. A reação térmica pode ocorrer sob uma variedade de atmosferas incluindo: ar, vácuo, gás inerte, gases oxidantes/ redutores, etc., bem como uma variedade de pressões, incluindo: alto vácuo, alta pressão, pressão constante ou pressão controlada [89].

O instrumento TGA pesa continuamente uma amostra à medida que é aquecida. À medida que a temperatura aumenta, a percentagem de peso de cada mudança de massa resultante pode ser medida. A análise termogravimétrica é frequentemente combinada com outro processo ou usada em conjunto com outros métodos analíticos.

Por exemplo, um equipamento de termogravimetria às vezes é conectado a um espectrómetro de massa.

Os dados termogravimétricos recolhidos são projetados num gráfico de massa ou percentagem da massa inicial em função da temperatura ou tempo. Este gráfico é referido como uma curva TGA. A primeira derivada da curva TGA (a curva DTG) é importante, pois através desta é possível determinar pontos de inflexão úteis para interpretações com mais profundidade, bem como análise térmica diferencial.

O gráfico de TGA pode incluir as seguintes características [88]:

- (i) Uma porção horizontal ou *plateau*, que é indicativo de peso constante.
- (ii) uma porção curva; a inclinação da curva é indicativa da taxa de perda de peso.
- (iii) Uma inflexão que pode implicar a formação de um composto intermediário. Pode, no entanto, ser devido a perturbações na taxa de aquecimento.

2.3. Espectroscopia de absorção atómica (AAS)

A espectroscopia de absorção atómica é uma importante técnica instrumental para análise quantitativa e qualitativa de elementos metálicos e não-metálicos.

Desde a sua invenção, a espectroscopia de absorção atómica (AAS) ganhou consenso como método padrão para a análise de elementos metálicos e não metálicos. A AAS é amplamente aceite porque a técnica tem um elevado grau de especificidade a elementos metálicos e fornece sensibilidade analítica no nível de partes por milhão e partes por bilião. O espectrofotómetro é constituído por três partes essenciais: fonte de radiação, atomizador, no qual os átomos da amostra são produzidos, e por fim o detetor, que mede a intensidade de luz, e transforma num sinal elétrico amplificando (Figura 18). A quantificação em AAS é realizada medindo a quantidade de radiação absorvida pelas espécies absorventes num determinado comprimento de onda. Os princípios de quantificação em AAS baseiam-se na lei de Beer-Lambert, ou seja, que o aumento na absorbância tem uma relação linear com a concentração de átomos na fase gasosa [90].

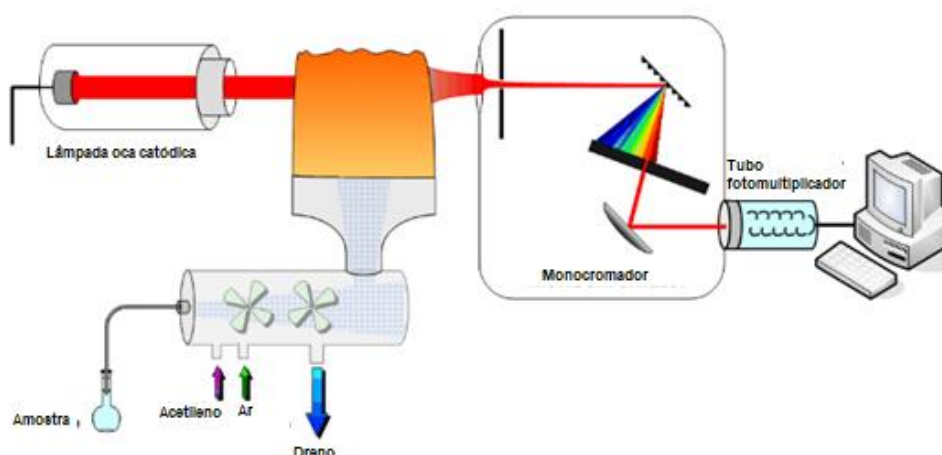


Figura 18 - Esquema de espectroscopia de absorção atômica adaptado de <http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/labmatters/instruments/aa/aa.htm>

A fonte da linha de radiação empregue com maior frequência em AAS é a lâmpada de cátodo oco (HCL). A seletividade é conseguida revestindo o interior do cátodo, com o elemento de interesse. O interior do tubo é evacuado e preenchido com um gás inerte, como néon. Sob o potencial aplicado, os átomos de néon tornam-se ionizados no ânodo e são acelerados em direção ao cátodo. A energia cinética dos iões de néon acelerados é transmitida ao material do cátodo por impacto, fazendo com que alguns átomos de metal sejam expelidos da superfície do cátodo para a fase gasosa [90]. Os átomos de metal sofrem colisões com outros iões de néon, produzindo átomos de metal excitados. Durante o relaxamento para o estado fundamental, os átomos de metal emitem radiação nos seus comprimentos de onda característicos [91].

O passo de atomização pode ser executado com sucesso por métodos de chama ou eletrotérmicos. Em qualquer um dos dois métodos, a energia térmica é usada para vaporizar o material e quebrar as ligações químicas dentro das moléculas componentes. Em AAS de chama, a amostra a ser analisada deve primeiro ser dissolvida num solvente adequado. A solução contendo analito é tipicamente convertida em aerossol por um nebulizador e posteriormente conduzida para a chama com gás oxidante da chama como um gás de nebulização. A pressão diferencial do gás oxidante, entre a solução a ser analisada e a cabeça do queimador, puxa a solução através de um tubo capilar para a corrente de gás oxidante. O fluxo é expandido através de um pequeno orifício para produzir gotículas com uma pequena gama de distribuição de tamanho. Misturas de gases de chama típicos usados em AAS incluem ar-acetileno ou protóxido de nitrogénio-

acetileno, proporcionando temperaturas máximas de operação de 2400 °C e 2800 °C, respetivamente [92].

2.4. Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

O uso de sensores para monitorização de metais pesados em meio aquoso é amplamente visto como uma ferramenta poderosa. Os sensores óticos acoplados a um detetor de UV-Vis, permitem o monitoramento em tempo real. As principais vantagens do uso de métodos espectroscópicos para monitorização incluem a velocidade inerente de análise e sensibilidade. O desenvolvimento de sondas de fibra ótica e células de fluxo permitiu a facilidade de implementação de métodos espectroscópicos para monitorização em tempo real.

Este tipo de espectroscopia utiliza uma fonte baseada em duas lâmpadas, geralmente, uma lâmpada de deutério para a região correspondente ao UV e uma de tungsténio/ halogénio para a região do visível. A luz emitida passa por uma rede de difração, onde é dividida nos diversos comprimentos de onda. O equipamento pode ser de feixe duplo ou simples, sendo que o que os distingue é a presença de uma célula de referência e uma célula de amostra no caso do feixe duplo, enquanto no feixe simples apenas temos a célula. No equipamento de feixe simples é necessário realizar a linha de base antes da análise da amostra, enquanto no de feixe duplo esta análise é sempre realizada em simultâneo, estando menos suscetível a pequenas variações. Por fim, a luz após passar pela amostra/ referência chega ao detetor, onde de seguida é traduzida a informação para um espetro no computador.

A espectroscopia baseia-se no estudo da interação entre ondas originadas no espetro eletromagnético e moléculas presentes na matriz da amostra em análise. A espectroscopia UV-Vis é um método sensível em espectroscopia molecular que utiliza luz ultravioleta e visível na faixa de comprimento de onda entre 200 e 780 nm. A absorção de luz UV (ultravioleta) e Visível é restrita a certos grupos funcionais moleculares chamados cromóforos, nos quais os eletrões são excitados em diferentes frequências [93].

A radiação absorvida segue a lei de Lambert Beer (5):

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon * c * l \quad (5)$$

em que A corresponde à absorvância, I_0 a intensidade de luz incidente, I a intensidade de luz após passar pela amostra, ε a absortividade molar da substância a analisar, c a concentração e, por fim, l a distância que a luz atravessa pela amostra.

Quando a radiação atravessa a amostra, é absorvida pelo analito, causando a energia desta radiação a excitação dos eletrões de uma orbital molecular de menor energia para uma orbital de maior energia. Para que ocorra absorção nesta zona do espectro eletromagnético, é necessário que as moléculas possuam eletrões π ou eletrões não-ligantes (eletrões n) [94].

Capítulo 3 - Procedimento experimental

Este capítulo foca as técnicas e os métodos utilizados, explicando todos os parâmetros definidos.

3.1. Síntese e caracterização de membranas

Durante o processo de síntese de membranas foram realizadas diversas tentativas até obter as formulações finais. Diferentes componentes foram adicionados consoante a necessidade, sempre realizando o estudo das quantidades dos componentes e o seu efeito nas propriedades das membranas.

As membranas foram de seguida caracterizadas através de diversos métodos e técnicas.

3.1.1. Materiais e reagentes

Na síntese de membranas foi utilizada água ultrapura *Millipore* para a preparação das soluções aquosas. O material de vidro de laboratório foi mantido em solução de ácido nítrico a 0,5 % durante a noite, antes de cada utilização, sendo passado por água ultrapura. Utilizaram-se como reagentes: quitosano, baixo massa molecular (Sigma Aldrich), sal de sódio de sulfato de condroitina (Carbosynth), fucoidano, *fucus vesiculosus extract* (Marinova), Tetraetilortossilicato (≥ 98 %, Acros Organics), ácido acético ($\geq 99,7$ %, Sigma Aldrich), etanol absoluto (AGA), ácido clorídrico (≥ 37 %, Fluka), glicerol anidro ($\geq 99,5$ %, Fluka), solução de glutaraldeído (70 % em água, Sigma Aldrich) e ácido nítrico (65 %, PanReac). Na determinação do grau de inchamento das membranas foi utilizada água ultrapura *Millipore*.

3.1.2. Instrumentação

Utilizou-se um espectrómetro de absorção atómica da PerkinElmer instruments, AAnalyst 200, para monitorização do catião chumbo. Para a lavagem das membranas, recorreu-se a um agitador orbital, ScanSci SK-330-Pro. Para a remoção da água que não se incorporou na membrana, durante o processo de determinação do grau de

inchamento utilizou-se a microcentrifuga da ScanSci - Hermle Z 207 M. A medição da espessura foi realizada com recurso a um paquímetro digital – Powerfix. A determinação da composição das membranas foi realizada com recurso a duas técnicas, a primeira sendo a espectroscopia de infravermelho, em que se utilizou um espectrofotómetro com transformada de Fourier, Bruker FT-IR System Tensor 27, acoplado com um acessório de ATR, PIKE MIRacle, a segunda técnica foi a termogravimetria, realizada através do equipamento Hitachi - STA 7200 RV Analyzer.

3.1.3. Procedimentos

A obtenção de uma síntese final foi um processo demorado, tendo passado por vários passos. Diversas proporções foram estudadas para os diferentes componentes, e diferentes componentes foram adicionados consoante a necessidade de ultrapassar obstáculos que surgiam.

Todo o processo de síntese decorreu sob agitação magnética, sempre a cerca de 3000 rpm e à temperatura ambiente.

Síntese da membrana de quitosano e sílica (CH-SiO₂)

Inicialmente, a síntese foi de acordo com uma já descrita na literatura [31]. A síntese consistiu na preparação de duas soluções iniciais, que seriam posteriormente adicionadas uma à outra.

A solução de quitosano (CH) teve a concentração 3 % (m/v) em 2 % de ácido acético.

A solução de TEOS é essencial para a estabilidade da membrana, para formação e incorporação de sílica pelo processo de sol-gel. Esta solução, de acordo com a literatura, consistia na adição de 22,2 mL de TEOS, 22,2 mL etanol, 88,8 mL de água desionizada e 5 mL de HCl a 0,1 mol.dm⁻³, deixada em agitação magnética por um período de 24 h.

A formulação da membrana final compreendeu a adição de 5 mL da solução de TEOS à solução de 10 mL de quitosano, em agitação durante 2 h e posterior deposição de 10 mL numa caixa de Petri com cerca de 80 mm de diâmetro, onde ficou a secar à temperatura ambiente durante 1 dia, ao fim do qual se obtinha uma membrana.

Prepararam-se também membranas em que foi adicionado um agente reticulante e / ou um agente plastificante. O agente reticulante escolhido foi o glutaraldeído (Glut),

tendo sido testadas diversas proporções glutaraldeído: monómero de quitosano. As proporções estudadas, em número de moles, foram as seguintes: 1,5:1, 1:3, 1:15, 1:50, e 1:150 (Tabela 5).

As soluções foram preparadas através da diluição da solução de glutaraldeído a 70 % com água *Millipore*.

Tabela 5 - Volumes e concentrações das respetivas soluções e proporções em nº de moles estudadas para Glut:CH

V(CH 3 % (m/v))/ mL	V(solução de TEOS)/ mL	[Glu]/ % (v/v)	V(Glu)/ µL	Glu:CH
10 mL	5 mL	70	375	1,5:1
		70	100	1:3
		25	50	1:15
		2,5	150	1:50
		2,5	50	1:150

Relativamente ao processo de síntese anteriormente descrito, neste caso, após as 2 h de agitação foram adicionadas diferentes quantidades de glutaraldeído, ficando mais 1 h em agitação magnética e de seguida depositados 15 mL da mistura na caixa de Petri.

No caso do agente plastificante, o composto escolhido foi o glicerol (Gli), tendo-se estudado as seguintes proporções: 1:70, 1:7, 1:2 e 1:1, em número de moles de glicerol por moles de monómero de quitosano (Tabela 6).

As soluções de glicerol foram também obtidas através da diluição de glicerol 99,5 % com água *Millipore*.

Tabela 6 - Volumes e concentrações das respectivas soluções e proporções em nº de moles estudadas para Gli:CH

V(CH 3 %(m/v))/ mL	V(solução de TEOS)/ mL	V(Glu 2,5 %)/ µL	Gli / %(v/v)	V(Gli)/ µL	Gli:CH
10 mL	5 mL	150	0,1	2	1:70
			1		1:7
			4		1:2
			8		1:1

O processo de síntese decorreu semelhante aos anteriores. Acrescentando apenas o passo da adição da solução de glicerol que fica 2 h em agitação antes da adição da solução de glutaraldeído. Da solução final, diferentes volumes, entre 15 e 8 mL, foram depositados numa caixa de Petri de 80 mm de diâmetro de modo a estudarem-se espessura da membrana e os efeitos nas suas propriedades mecânicas e óticas.

Síntese das membranas contendo sulfato de condroitina (CH-CS) e fucoidano (CH-Fd)

A síntese destas membranas teve inicialmente por base as proporções já presentes num artigo entre os dois biopolímeros CH e CS [95]. Realizou-se um estudo de modo a maximizar a quantidade de sulfato de condroitina/ fucoidano. Na Tabela 7 estão as proporções estudadas, bem como as concentrações e volumes de cada solução utilizados.

Tabela 7 - Estudo das quantidades e proporções de biopolímeros

Membrana	CH %(m/v)	V(CH)/ mL	CS/Fd %(m/v)	V(CS/Fd) mL	Proporção (CS/Fd:CH)
CH-CS	3	10	4	2	1:10
	3	10	3	2	1:14
	3	10	0,5	2	1:85
	3	10	0,2	2	1:210
	3	8	0,2	4	1:86
	2,7	10	0,5	2	1:77
	3	7	0,2	5	1:59
	3	6	0,2	6	1:42
	3	5	0,2	7	1:30
	3	6	0,5	6	1:17
CH-Fd	3	8	0,1	4	1:199
	3	6	0,2	6	1:48
	3	6	0,3	6	1:32

Do estudo realizado, determinou-se as proporções máximas de biopolímero sulfato que seriam possíveis incorporar na membrana.

O processo de síntese das membranas de quitosano e sulfato de condroitina/fucoidano é em todo semelhante ao das membranas de CH-SiO₂, acrescentando apenas um passo inicial da adição da solução de sulfato de condroitina ou fucoidano à solução de quitosano, ficando 2 h sob agitação magnética, período após o qual se adicionou 3 mL da solução de TEOS. Depois segue o processo de adição de glicerol e glutaraldeído, descrito para CH-SiO₂, de acordo com os volumes e concentrações presentes na Tabela 5 e 6. No final foi realizado o estudo de diferentes volumes de deposição da solução obtida numa caixa de Petri de 80 mm de diâmetro. A solução foi deixada a secar na caixa de Petri durante 2 dias, à temperatura ambiente, período após o qual se obteve uma membrana.

A síntese das membranas pode ser descrita esquematicamente através da Figura 19.

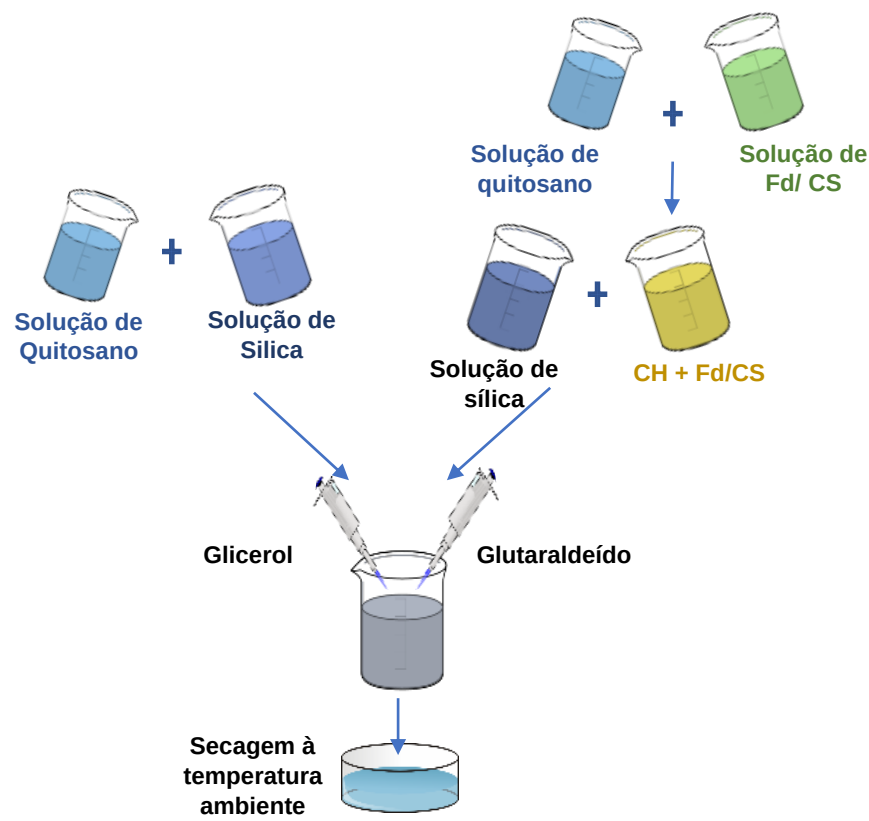


Figura 19 - Esquema da síntese, representação dos passos de adição das diferentes soluções

As sínteses finais escolhidas estão presentes na Tabela 8, com a respectiva denominação da membrana.

Tabela 8 - Resumo sínteses finais

Denominação	[CH]/ %(m/v)		V(CH)/ mL	[CS/Fd]/ %(m/v)	V/(CS/Fd)/ mL	V(TEOS)/ mL	V(Gli 8%)/ mL	V(Glu 2,5%)/ µL
CH-SiO ₂	3		10	-	-	5	2	150
CH-CS (1:210)			10	0,2 (CS)	2	3		
CH-Fd (1:490)			10	0,1 (Fd)	2			
CH-CS (1:42)			6	0,2 (CS)	6			
CH-Fd (1:48)			6	0,2 (Fd)	6			

Síntese das membranas molecularmente impressas (MIM)

Para obtenção do MIM recorreu-se ao mesmo processo de síntese descrito anteriormente para as diferentes membranas, com a alteração da adição do sal de chumbo, Pb(NO₃)₂, à solução de quitosano, devido a esta possuir um pH ácido, que

facilita a sua dissolução e estabiliza a forma livre Pb(II) livre. De modo a testar a quantidade máxima de Pb(II) que era possível incorporar na membrana, para obter o máximo de locais de reconhecimento possível, mas sem comprometer as suas propriedades mecânicas, foram testadas diferentes proporções de moles de catião chumbo por moles de monómero de quitosano, nomeadamente, 1:4, 1:8, 1:10 e 1:12.

Remoção do catião chumbo

De modo a remover o catião chumbo da membrana, recorreu-se à lavagem do material com ácido nítrico. A lavagem foi feita com HNO_3 $0,001 \text{ mol.dm}^{-3}$, utilizando 40 mL por cada 150 mg de membrana em agitação, no agitador orbital para não destruir a membrana, durante 15 min. O processo foi repetido 8 vezes, de modo a garantir a remoção completa dos catiões metálicos. A remoção do catião chumbo foi monitorizada através da espectroscopia de absorção atómica. No final, a membrana foi deixada em água *Millipore*, uma vez que esta possui um elevado grau de inchamento, pelo que deixando a membrana secar poderia colapsar os locais de reconhecimento criado pela impressão molecular.

Para realizar a caracterização das membranas recorreu-se a diferentes determinações como o grau de inchamento e espessura e algumas técnicas instrumentais como o FTIR-ATR e TGA. Através destas técnicas foi possível caracterizar a membrana em relação à sua estabilidade, composição e porosidade.

Grau de inchamento (Sw)

Para determinar o grau de inchamento colocou-se 100 mg de cada membrana em tubos de microcentrifuga de 2 mL, com 1,5 mL de água ultrapura, durante 24 h em agitação. Após o tempo de inchamento, centrifugou-se de modo a facilitar a remoção da água que não tinha sido incorporada na membrana, 12000 rpm durante 5 min. O cálculo do grau de inchamento foi realizado através da seguinte expressão (6):

$$Sw (\%) = \frac{W_f - W_0}{W_0} \times 100 \quad (6)$$

em que W_0 representa a massa do material inicial e W_f a massa do material final.

O procedimento foi feito em duas duplicado para todas as diferentes membranas.

Esta técnica é importante, pois permite avaliar a capacidade da membrana conseguir interagir com a solução aquosa, uma vez que se o seu inchamento for praticamente nulo, pouca ou nenhuma solução, que conterá o analito de interesse, estará em contacto com os grupos funcionais que se encontram no interior. Para além deste fator, fornece outra informação acerca da estabilidade da membrana mergulhada em água *Millipore*, Foi considerada uma membrana instável, quando ao fim de 24 h em imersa em água a membrana apresentasse graus de inchamento elevados (na ordem dos 900 %) e muito variáveis, para além de se desfazer com facilidade quando aplicada agitação.

Maleabilidade

As membranas foram submetidas a testes que consistiram em fazer-las dobrar sobre si mesmas, como representado na Figura 20, de modo a classificar a sua maleabilidade.

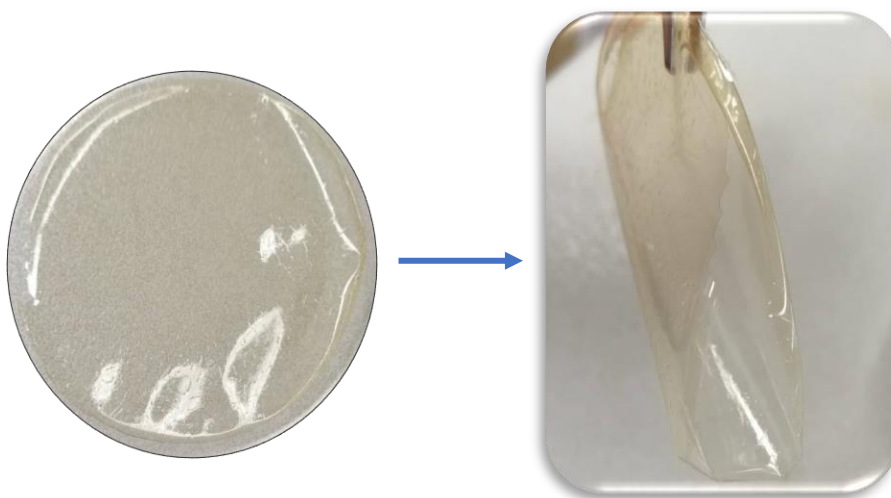


Figura 20 - Exemplo de membrana maleabilidade aceitável

As membranas foram classificadas como possuindo maleabilidade aceitável ou maleabilidade não aceitável. Uma membrana era considerada de maleabilidade aceitável quando se possuísse capacidade de dobrar 360 °C pelo menos 10 vezes sem quebrar. No caso das membranas de maleabilidade não aceitável, ainda foi dividida em três níveis:

- Maleabilidade reduzida: uma membrana com capacidade de dobrar 360 °C entre 4 e 9 vezes sem quebrar;
- Rigidez intermédia: uma membrana com capacidade de dobrar 360 °C entre 2 e 3 vezes sem quebrar;
- Rígida elevada: uma membrana sem capacidade de dobrar 360 °C mais do que 1 vez sem quebrar.

Espessura das membranas

O estudo da espessura das membranas foi realizado através da utilização de um paquímetro digital, realizando 8 medições aleatórias por cada membrana, com cerca de 300 mg. De seguida foi calculado a média e o desvio padrão.

Cálculo da percentagem mássica dos componentes teórica

De modo a calcular a percentagem mássica teórica de cada componente no composto final, recorreu-se à seguinte expressão (9):

$$\%W_A = \frac{m_A}{m_A + m_B + \dots} \times 100 \quad (9)$$

onde m_A representa a massa do componente A e m_B a massa do componente B.

Para este cálculo foi tido em conta apenas os solutos presentes na solução, nomeadamente, a massa de sílica obtida através da conversão do número de moles de TEOS em moles de sílica e seguida determinação da massa, a massa de quitosano, e nas membranas respetivas a massa de sulfato de condroitina ou fucoidano, a massa de glicerol e por fim de glutaraldeído.

Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

De modo a verificar se os vários componentes esperados constituíam o material sintetizado, foram realizados espectros de infravermelho utilizando um espectrofotómetro com refletância total atenuada com transformada de Fourier (ATR-FTIR), numa gama de leitura de 600 a 4000 cm^{-1} . O espectro de referência (“branco”) utilizando para a realização dos espectros das membranas foi o próprio ar.

Análise por Termogravimetria (TGA)

Cada membrana foi analisada por termogravimetria, nas condições de uma rampa de 10 °C por minuto, da temperatura ambiente até uma temperatura de 800 °C, sob fluxo de nitrogênio.

Em certos casos, é possível quantificar o biopolímero através do seguinte sistema de equações (10):

$$\begin{cases} \text{massa perdida}_{\text{biopolímero}} = x \cdot m_{\text{biopolímero}} + y \cdot m_{\text{SiO}_2} \\ \text{massa total} = m_{\text{biopolímero}} + m_{\text{SiO}_2} \end{cases} \quad (10)$$

onde x representa a fração de biopolímero e y a fração de sílica. A massa total corresponde à massa colocada no cadinho, a massa perdida é a soma de todas as perdas de massa ao longo da análise, subtraindo a perda de massa inicial, até cerca dos 100 °C, que corresponde à perda de água.

3.2. Desenvolvimento de membranas sensoras para Pb(II)

A obtenção de uma membrana sensora a nível ótico passa pela incorporação de um cromóforo num material de suporte. Nesta tese, as membranas desenvolvidas funcionaram como material de suporte para o sensor. O cromóforo irá produzir um sinal ótico com a alteração de cor devido à formação de um complexo com o Pb(II).

3.2.1. Materiais e reagentes

Foi utilizada água ultrapura *Millipore* para a preparação das soluções aquosas. O material de vidro de laboratório foi mantido em solução de ácido nítrico a 0,5 % durante a noite, antes de cada utilização, sendo passado por água ultrapura. Utilizaram-se como reagentes: 1,5-difeniltiocarbazona - ditizona (MERCK), dimetilsufóxido (DMSO) ($\geq 99,9\%$, Fisher), etanol absoluto (AGA) e solução de glutaraldeído (70 % em água, Sigma Aldrich), ácido acético ($\geq 99,7\%$ Sigma Aldrich), acetato de sódio ($\geq 99\%$ Sigma Aldrich), ácido nítrico (65 % PanReac), sal de nitrato de chumbo ($\geq 99,0\%$ Sigma Aldrich).

3.2.2. Instrumentação

Utilizou-se um espectrofotómetro de UV-Vis da PG *instruments*, T60, de modo a verificar as alterações provocadas no espectro de absorção da membrana com a incorporação do cromóforo e após imersão em diferentes soluções. Recorreu-se ao medidor de pH, Metrohm 654 pH Meter, para ajustar o pH da solução tampão.

3.2.3. Procedimentos

A incorporação do cromóforo escolhido – a ditizona – passou por diversos passos, tendo inicialmente sido estudado qual o melhor método de incorporação.

Foram realizadas três tentativas diferentes de incorporação da ditizona. Começou-se por testar a adição de uma solução etanólica de ditizona diretamente durante a síntese da membrana. De seguida, foi realizada a incorporação através da imersão de 10 mg da membrana seca e previamente deixada 1 h imersa em água, em 10 mL de uma solução etanólica de ditizona de $0,5 \text{ mmol.dm}^{-3}$, por 3 h. Por fim, foi testada a imersão numa solução de $0,5 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ditizona em DMSO:Água (v/v – 70/30). Foram analisadas as alterações óticas provocadas na membrana através da espectroscopia de UV-Vis.

Testou-se, também, a imersão prévia da membrana numa solução de glutaraldeído. O processo consistiu na imersão de 300 mg de membrana em 20 mL de uma solução de glutaraldeído, tendo sido testadas diversas concentrações (0,5 %, 0,25 %, 0,05 % e 0,025 %), durante um período de meia hora. De seguida foi lavada fazendo-se passar a membrana 3 vezes por 20 mL de água ultrapura, de modo a garantir que o glutaraldeído que não se ligou à membrana é removido.

Após determinar o melhor método de incorporação da ditizona passou-se para os testes de otimização da concentração da ditizona, tempo de imersão em ditizona e tempo de imersão na solução do catião metálico de interesse.

Otimização da membrana sensora

A otimização do sensor é um ponto de extrema importância para a obtenção de um bom sinal. Neste ponto foram realizados essencialmente três otimizações: i) otimização

da concentração de ditizona, ii) otimização do tempo de imersão na solução de ditizona e iii) otimização do tempo de imersão em chumbo.

Antes de ocorrer a otimização foi necessário a preparação de algumas soluções.

Preparação da solução tampão

Foram preparadas soluções tampão acetato de sódio/ ácido acético 2 mmol.dm^{-3} a pH 5,5. Por 1 L de solução foram dissolvidos 0,1387 g do sal acetato de sódio e adicionados 0,0177 mL de ácido acético, sendo o pH ajustado com HNO_3 a 5 %.

Preparação de Soluções de Iões Metálicos

Preparou-se as soluções dos cátions metálicos a partir do sal de nitrato de chumbo $[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2]$. O sal foi dissolvido em tampão acetato/ ácido acético 2 mmol.dm^{-3} a pH 5,5. Preparou-se uma solução de 100 ppm de $\text{Pb}(\text{II})$, a partir da qual se obteve uma solução de 10 ppm. As soluções necessitam de ser preparadas a cada dia de análise, devido à eventual instabilidade dos cátions metálicos neste tampão.

Otimização da concentração e tempo de imersão em ditizona

Testou-se 4 concentrações de solução de ditizona (0,075, 0,1, 0,25 e $0,75 \text{ mmol.dm}^{-3}$), que foram preparadas dissolvendo a quantidade de sólido adequada em DMSO:Água (70:30). Devido à intensa cor verde escura que a solução obtém, que impossibilita verificar visualmente a dissolução completa, a solução foi deixada 3 h em agitação no agitador magnético e em seguida 20 min no ultrassom, de modo a garantir uma boa dissolução.

De seguida, 300 mg da membrana CH-SiO_2 foram imersas em 20 mL das soluções de ditizona pelo mesmo período de tempo, sendo neste caso utilizadas 5 h de imersão. A membrana após imersão foi lavada 3 vezes com 20 mL de água ultrapura e 2 vezes com tampão. De seguida foram analisados os espectros UV-Vis das membranas obtidas, onde o “branco” foi a solução tampão.

Por fim, a membrana foi deixada imersa por 2 min numa solução contendo 10 ppm de cátions chumbo em tampão, após o qual analisou-se através do espectrofotômetro UV-Vis, neste caso o “branco” utilizado foi a membrana antes de ser imersa na solução do ião metálico.

Para otimização do tempo de imersão as membranas foram preparadas de acordo com o descrito anteriormente, mas apenas para a concentração de $0,25 \text{ mmol.dm}^{-3}$, fazendo-se variar os tempos de imersão nesta solução.

A Tabela 9 apresenta de forma resumida, as concentrações e tempos estudados para a otimização.

Tabela 9 - Diferentes concentrações e tempos de imersão na solução de ditizona

[Ditizona]/ mmol.dm^{-3}	Tempo de imersão/ h
0,75	5
0,25	1
0,25	3
0,25	5
0,25	18
0,25	24
0,18	5
0,075	5

Os espectros obtidos foram analisados recorrendo ao programa OriginPro8. Na Figura 21 estão representados espectros exemplos dos obtidos, em que se verifica a redução da banda a 460 nm correspondente à ditizona sem complexar e o aparecimento de uma banda a 550 nm devido à formação do complexo ditizona-Pb(II). Utilizando como linha de base uma reta entre o mínimo da banda a 460 nm e um ponto intermédio entre 630 e 700 nm, onde estabiliza a absorvância, determinou-se o máximo de absorvância entre o ponto máximo da banda e a linha de base desenhada e a área (exemplo - Figura 21a). O mesmo se procedimento foi realizado para determinar o decréscimo da banda a 460 nm, tendo se definido como linha de base uma reta entre o máximo da banda a 550 nm e o ponto a 380 nm (Figura 21b).

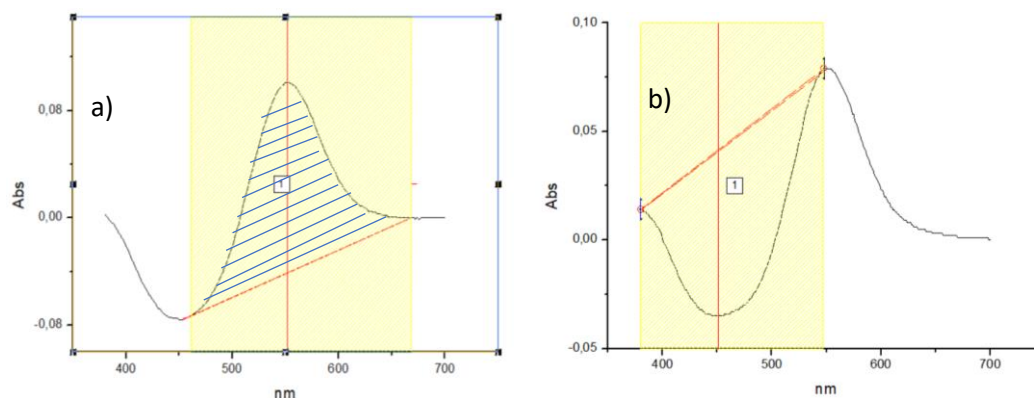


Figura 21 - Exemplo de método utilizado para determinar altura e área da banda a 550 nm (a) e a 460 nm (b)

Otimização do tempo de imersão nas soluções de iões metálicos

Com a concentração e tempo ótimo de imersão em ditizona otimizados testou-se o tempo de imersão numa solução de 10 ppm de catião chumbo.

Fez-se variar o tempo de imersão de 1 a 15 min. A membrana sensora foi submetida de imediato a análise por espectroscopia de UV-Vis, onde se utilizou sempre como “branco” a membrana sensora a ser analisado antes da imersão na solução de Pb(II), utilizando-se leituras dos 380 a 700 nm.

3.3. Avaliação da membrana sensora para Pb(II)

3.3.1. Materiais e reagentes

Foi utilizada água ultrapura Millipore para a preparação das soluções aquosas. Utilizaram-se como reagentes: solução tampão (preparada de acordo ao ponto anterior), sal de nitrato de chumbo ($\geq 99,0\%$ Sigma Aldrich) e nitrato de cádmio tetrahidratado (MERCK).

3.3.2. Procedimento

Preparação de Soluções de Iões Metálicos

Preparou-se as soluções de iões metálicos a partir dos sais de nitrato de chumbo $[Pb(NO_3)_2]$ e nitrato de cádmio $[(Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)]$. Os sais foram dissolvidos em tampão

acetato/ ácido acético 2 mmol.dm^{-3} a pH 5,5. Preparou-se uma solução de 100 ppm de Pb(II) e Cd(II), a partir da qual se obteve os padrões necessários de 0,1 - 10 ppm.

Calibração do sensor

Após a preparação das membranas sensoras otimizadas, realizou-se a imersão cronometrada da membrana nas diferentes soluções padrão dos iões metálicos (entre 0,1 a 10 ppm do catião metálico), tendo de imediato sido analisada a membrana através do espectrofotómetro de UV-Vis da *PG instruments* T60, utilizou-se como “branco” a mesma membrana sensora antes da imersão, com leituras na gama dos 380 a 700 nm. Todos os espetros de UV-Vis obtidos foram analisados através do programa OriginPro8.

Estudo do efeito de espécies interferentes

As membranas sensoras foram imersas por 10 min em diferentes soluções, todas contendo uma concentração de cádmio (5 ppm), mas com diferentes concentrações de chumbo (0,1 a 5 ppm). Após a imersão, a membrana foi analisada por espectroscopia de UV-Vis, utilizando como “branco” a membrana antes da imersão. Por fim, realizou-se o estudo dos espetros através do programa OriginPro8.

Capítulo 4 - Resultados e discussão

Este capítulo encontra-se dividido em três tópicos - a obtenção das membranas, a incorporação da ditizona nas membranas, para obter um sensor e, por fim, a obtenção de curvas de calibração para o analito escolhido.

4.1. Desenvolvimento da síntese de membranas

Na síntese de membranas existem diversos factores a ter em conta, sendo essencial determinar as características desejadas tendo em conta a sua finalidade. Neste trabalho, procurou-se obter membranas translúcidas, finas, maleáveis e com elevada estabilidade, que funcionassem como base para sensores óticos, bem como serem seletivas ao analito de interesse.

O grande foco desta tese era a obtenção de membranas tendo por base biopolímeros, obtidos de extração de desperdícios marinhos. Como tal, após pesquisa decidiu-se que o quitosano, sulfato de condroitina e fucoidano seriam bons candidatos. Sendo o quitosano um biopolímero já muito conhecido por formar filmes por si só, auxiliaria a formação de membranas.

Foram sintetizados 3 tipos de membranas diferentes, embora, como descrito no ponto 2.1, tendo sido realizadas diversas tentativas. O primeiro tipo de membrana a ser sintetizada foi a membrana contendo apenas um biopolímero, nomeadamente o quitosano, que possui facilidade em formar filmes finos, em que se usou solução de TEOS de modo a melhorar a estabilidade, tendo sido adicionados ainda outros componentes, de acordo com o que será explicado mais em pormenor nos pontos seguintes.

No que se relaciona com os outros dois tipos membranas, estas consistiam na incorporação de um biopolímero adicional com o intuito de melhorar a membrana, procurando obter vantagens associadas aos outros biopolímeros, tendo em conta a finalidade de integrar um sensor ótico para catião chumbo. Através de um estudo já realizado pelo grupo de investigação, da complexação entre o CS e o Fd e os catiões Pb(II) e Cd(II), envolvendo a técnica de diálise, veio mostrar as vantagens destes biopolímeros perante o catião chumbo. Este estudo permitiu através da obtenção de

isotérmicas (Figura 22) determinar afinidades dos biopolímeros pelos cátions estudados (Tabela 10).

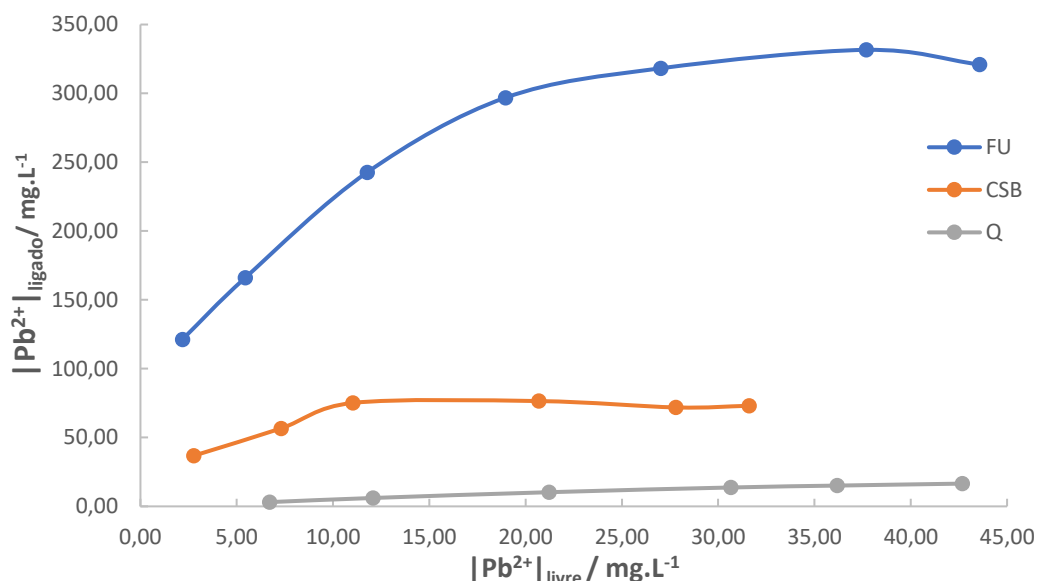


Figura 22 - Isotérmica para o fucoidano, sulfato de condroitina e quitosano

Tabela 10 - Parâmetros da complexação para os biomateriais a incorporar nas membranas, para os cátions Pb(II) e Cd(II)

Biomaterial	Pb(II)		Cd(II)		Selectividade*	
	$ L _{total} / mol.L^{-1}$	$K / L.mol^{-1}$	$ L _{total} / mol.L^{-1}$	$K / L.mol^{-1}$	α ($ L _{total} / mol.L^{-1}$)	α ($K / L.mol^{-1}$)
Fu	$1,79 \times 10^{-3}$	$3,84 \times 10^4$	$2,26 \times 10^{-3}$	$1,07 \times 10^4$	0,790	3,59
CS	$5,10 \times 10^{-4}$	$4,17 \times 10^4$	$6,30 \times 10^{-4}$	$1,83 \times 10^4$	0,810	2,28

*seletividade calculada de acordo com o quociente entre $|L|$ Pb(II) e $|L|$ Cd(II) e o quociente entre K Pb(II) K Cd(II), para $\alpha |L|_{total}$ e αK , respetivamente

Na Tabela 10 estão presentes os valores obtidos através dos ajustes das isotérmicas para a capacidade ($|L|$), afinidade (K) e seletividade (α). Não foi possível encontrar os respetivos valores destas grandezas para o biopolímero quitosano, uma vez que a sua isotérmica não ajustou a nenhum modelo. No entanto, é possível verificar uma melhor afinidade (K) destes biopolímeros pelo cátion chumbo, em comparação com os valores obtidos para o cátion cádmio. No caso do fucoidano o valor de K é mais de 3 vezes superior para o cátion chumbo em comparação com o de cádmio, enquanto para o sulfato de condroitina é 2 vezes superior. O fucoidano apresenta mais locais de reconhecimento do que o sulfato de condroitina, algo que vai de encontro com a afinidade dos dois compostos, sendo maior para o fucoidano do que para sulfato de

condroitina. Estes resultados revelam que estes biopolímeros podem apresentar vantagens promissoras aquando a sua incorporação na membrana, uma vez que comparando as curvas das isotérmicas dos três biopolímeros (Figura 22) se nota uma maior $[Pb(II)]$ ligado ao biopolímero no caso do fucoidano e sulfato de condroitina, comparativamente com o quitosano, sendo 20 vezes superior para o fucoidano e 5 vezes superior para o sulfato de condroitina.

Devido a outras investigações já realizadas neste grupo de investigação, recorreu-se à impressão molecular de modo a melhorar a capacidade de interação da membrana com o catião, criando locais de reconhecimento, e aumentar a seletividade pelo catião em estudo, uma vez que se revelou algo eficaz noutros estudos realizados com este tipo de biopolímeros [76, 78].

Com o intuito de aplicar estes biopolímeros numa membrana foi necessário testar diversas proporções de monómero de quitosano: sulfato de condroitina / fucoidano, em número de moles (Tabela 11), de modo a maximizar o teor de sulfato de condroitina e fucoidano presentes na membrana final.

Tabela 11 - Aspeto das soluções perante as diferentes proporções (CS/Fd:CH)

Membrana	Proporção (CS/Fd:CH)	Aspeto
CH-CS	1:10	Aparecimento de uma fase branca (Figura 23a)
	1:14	
	1:17	
	1:30	
	1:42	Solução translúcida
	1:59	
	1:77	
	1:85	
	1:86	
	1:210	
CH-Fd	1:490	Solução translúcida
	1:199	
	1:48	
	1:32	Aparecimento de uma fase castanha (Figura 23b)

Quando as quantidades dos biopolímeros sulfatados eram elevadas ocorria a formação de precipitados/ turvações (Figura 23), algo que se tentou combater fazendo a adição mais lenta sob agitação vigorosa, de modo a garantir que não havia concentrações elevadas localizadas. Outra tentativa foi a adição em ordem inversa, ou seja, da solução de quitosano à solução de sulfato de condroitina, e ainda se testou o aumento do pH da solução de quitosano, uma vez que estes biopolímeros (CS e Fd) são aniônicos e soluções muito ácidas podem causar a sua protonação, mas em todos os casos sem sucesso.

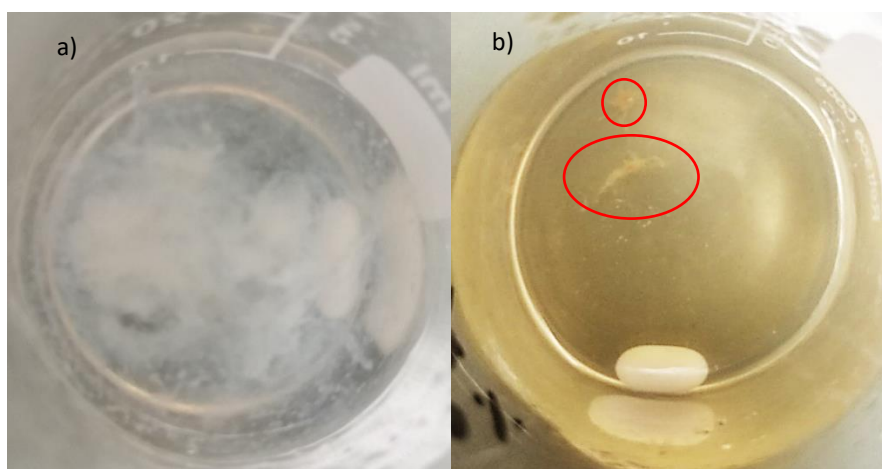


Figura 23 - Turvações formadas na síntese para a membrana de sulfato de condroitina a) e fucoidano b)

Foi realizado o restante do estudo para as membranas contendo as seguintes proporções 1:42 e 1:48, para CH-CS e CH-Fd, respectivamente, uma vez que representam a quantidade máxima que é possível incorporar na membrana, sem que haja a formação de novas fases

Decidiu-se também testar a possibilidade de obter membranas apenas com dois biopolímeros, quitosano e fucoidano / sulfato de condroitina, sem mais componentes, no entanto após o processo de formação das membranas estas não se separavam do vidro após a sua formação, algo que foi possível solucionar através da incorporação de SiO_2 . Este componente já se tinha revelado importante para melhorar as propriedades das membranas no caso em que a membrana apenas continha um biopolímero - o quitosano.

Foi ainda testada a formulação de um quarto tipo de membranas, que consistia em sulfato de condroitina e sílica, no entanto não se revelou nada promissor. Diferentes proporções entre os dois componentes foram testadas, recorreu-se ainda à utilização

de um agente reticulante – GPTMS (3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano) – no entanto em nenhum caso se formou uma membrana, apenas se formou um pó, pelo que foi descartada esta hipótese.

Estudo do efeito do glutaraldeído como agente reticulante

Devido às membranas de quitosano e sílica apresentarem alguns problemas a nível de propriedades mecânicas, mais em específicos a sua instabilidade em solução, a membrana apresentava-se instável, ou seja, quando sob agitação quebrava-se e apresentava graus de inchamento elevados e muito variáveis, foi necessário recorrer a um agente reticulante, nomeadamente o glutaraldeído, para aumentar a coesão do material. Realizou-se um estudo da adição deste composto, testando-se diferentes proporções de glutaraldeído e monómero de quitosano.

De acordo com o procedimento exposto em 2.1.3. e seguindo a equação (6), foi possível determinar os graus de inchamento das diferentes membranas. Através desta técnica foi possível ajustar a quantidade de glutaraldeído que funciona como agente reticulante, permitindo uma maior estabilidade da membrana e melhor controlo do grau de inchamento. Na Tabela 12 estão exemplificados os diferentes estudos realizados para a membrana de CH-SiO₂ e respetivo MIM.

Tabela 12 - Proporções de moles de glutaraldeído por moles de monómero de quitosano e o seu efeito no grau de inchamento para a membrana de CH-SiO₂

Glut:CH	%Sw	Observações
0:1	(850-950)	Membrana instável em solução
1,5:1	-	Membrana muito rígida, quebradiça e tom vermelho
1:3	-	Membrana rígida, quebradiça e tom laranja
1:15	-	Membrana quebradiça
1:50	(500-550)	Membrana um pouco rígida e NIM e MIM estáveis
1:150	(600-700)	NIM estável em solução / MIM instável em solução

NIM – material não-impresso; MIM – material molecularmente impresso.

A adição do agente reticulante começou por ser realizada de forma exagerada (1,5:1), ou seja, com mais reticulante do que biopolímero, e foi descartada de imediato, uma vez que apresentou uma cor intensa, bem como uma elevada rigidez. A proporção foi de seguida reduzida para 1:3, no entanto a membrana formada apresentava uma elevada rigidez, o que a tornava mais quebradiça, e um tom laranja escuro. Foi-se reduzindo gradualmente a proporção entre estes dois compostos, até obter uma membrana com tom semelhante à membrana sem glutaraldeído, com graus de inchamento mais baixos e melhor estabilidade em solução, comprometendo apenas um pouco a sua maleabilidade.

Para certas proporções não foi determinado o grau de inchamento, uma vez que a membrana apresentava propriedades mecânicas e óticas indesejáveis (Figura 24) para a finalidade pretendida, pelo que foi de imediato descartada.



Figura 24 - Imagem exemplo uma membrana de quitosano e sílica com excesso de glutaraldeído (1,5:1 – Glut:CH)

A proporção escolhida foi 1:50 (Glut:CH), uma vez que uma maior quantidade de glutaraldeído leva a uma elevada rigidez da membrana, aumentando a sua fragilidade, e uma menor quantidade de glutaraldeído torna o MIM instável quando imerso em solução, ou seja, ao fim de um dia em agitação, a membrana sofre um inchamento tão elevado que se desintegra.

Para as membranas CH-CS e CH-Fd foi realizado o mesmo estudo, tendo-se concluído que a proporção ideal neste caso seria 1:30.

Estudo do efeito do glicerol como agente plastificante

Embora o glutaraldeído tenha melhorado a estabilidade da membrana, tornou-a um pouco mais rígida. De modo a melhorar este parâmetro recorreu-se ao glicerol, uma vez que este pode funcionar como agente plastificante na presença de biopolímeros, pelo que se recorreu a este na tentativa de melhorar a maleabilidade da membrana.

De modo a obter uma boa maleabilidade testou-se diversas proporções de glicerol e monómero de quitosano em número de moles (Tabela 13).

Tabela 13 - Proporções de glicerol e monómero de quitosano, em nº de moles, e o seu efeito na maleabilidade da membrana CH-SiO₂

Gli:CH	Observações
1:70	Membrana um pouco rígida e frágil
1:7	Membrana um pouco rígida e frágil
1:2	Membrana com alguma maleabilidade
1:1	Membrana com boa maleabilidade

Inicialmente foram testadas quantidades muito reduzidas de glicerol, algo que se traduziu na inalteração da maleabilidade da membrana. À medida que se foi aumentando gradualmente a quantidade de glicerol incorporada na membrana, começou-se a notar uma melhoria na maleabilidade, até que na proporção de 1 mol de glicerol para 1 mol de monómeros de quitosano foi possível atingir a maleabilidade pretendida.

No caso das membranas de CH-CS e CH-Fd a proporção final, tendo em conta o mesmo teste realizado, foi de 2:1.

Desenvolvimento da síntese dos MIM

Para realizar a impressão molecular nas membranas foi necessária a adição de catião chumbo ao meio reacional, que foi adicionado sobre a forma do sal Pb(NO₃)₂, que se adicionou diretamente à solução de quitosano devido ao pH ácido desta, que facilita a dissolução do sal. Foram testadas diversas proporções. Inicialmente testou-se 1:4, ou seja, uma mol de catiões chumbo por quatro moles de monómero de quitosano,

devido a estudos já realizados [76, 78], mas a membrana perdeu qualidades mecânicas, tendo-se tornado frágil e com aspeto mais opaco. A perda de qualidades foi devida, possivelmente, à alteração da estrutura na presença de catião chumbo, uma vez que sacrifica grupos essenciais para a reticulação, pelo que em excesso pode impossibilitar a formação de uma boa coesão da membrana. Com o intuito de melhorar o MIM, reduziu-se gradualmente a proporção até 1:12, em que foi possível obter uma membrana com as propriedades mecânicas semelhantes às membranas análogas, NIM. O estudo foi realizado para as 3 diferentes membranas tendo-se chegado em todas à mesma conclusão.

Na Figura 25 está representado um esquema do que possivelmente ocorre durante o processo de impressão molecular, seguido da lavagem do material.

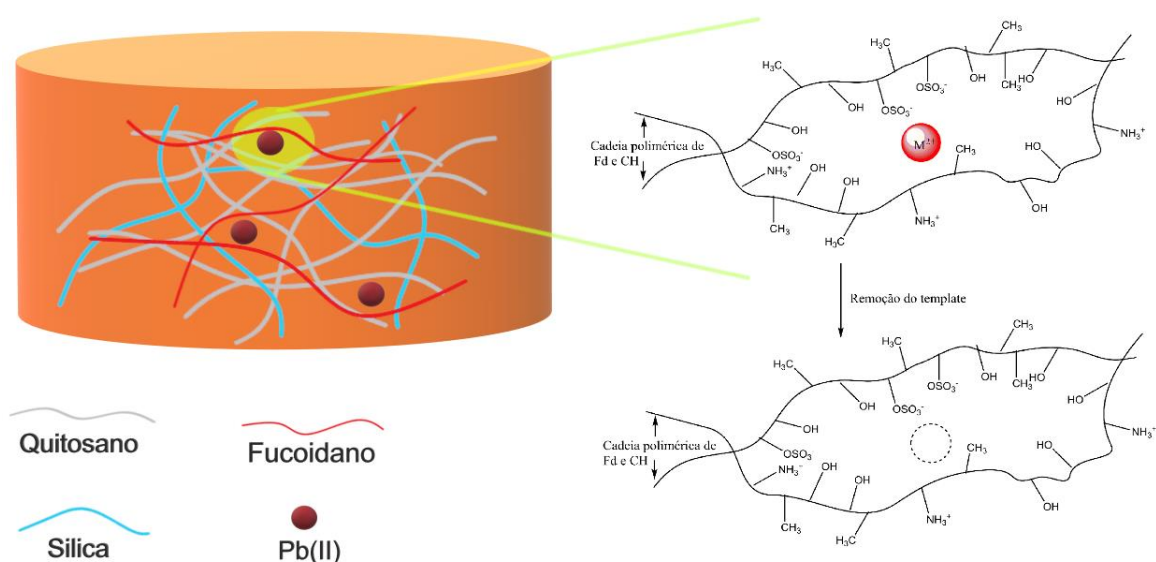


Figura 25 - Possível representação esquemática da impressão molecular para a membrana CH-Fd. De modo a simplificar não estão representados o glicerol e o glutaraldeído

Na Figura 25 é possível ver o encruzilhar de cadeias entre si, sendo que não está visível na figura a reticulação das cadeias de quitosano através do glutaraldeído como intermediário, nem a presença de glicerol.

Estudo da espessura da membrana

O estudo da espessura das diferentes membranas foi realizado testando-se diferentes volumes de deposição da solução da síntese final numa caixa de Petri de 80

mm de diâmetro. De seguida, após a membrana estar formada e seca, foi medida a espessura de acordo com o procedimento descrito em 2.1.3.. A espessura pretendida seria a mais fina possível, uma vez que uma membrana fina facilita processos de transferência de massa, mas que ainda permitisse obter uma membrana com boas propriedades mecânicas. Os resultados obtidos para a membrana CH-SiO₂ encontram-se presentes na Tabela 14.

Tabela 14 - Efeito do volume de deposição na espessura da membrana e nas suas propriedades mecânicas

Volume de deposição/ mL	Espessura/ µm	Observações
15	(80 ± 10)	Membrana robusta com boas propriedades mecânicas
10	(59 ± 16)	Membrana com boas propriedades mecânicas
8	(51 ± 10)	Membrana com boas propriedades mecânicas
< 8	-	Não permite uma boa cobertura da caixa de Petri

Foram testados diferentes volumes de deposição numa caixa de Petri com 80 mm de diâmetro. Testou-se inicialmente a deposição de 15 mL da solução final, que permitiu obter uma membrana com boas propriedades mecânicas, nomeadamente boa maleabilidade. No entanto, foi-se reduzindo gradualmente o volume de deposição até não ser possível formar uma membrana, ou quando as propriedades mecânicas desta fossem afetadas. O volume mínimo de deposição, para o caso da membrana de CH-SiO₂, que permitiu obter uma boa membrana e com boas propriedades mecânicas foi de 8 mL. Abaixo deste volume não foi possível obter uma membrana através deste método (conhecido como *casting method*), só através de outras técnicas seria possível obter uma membrana com espessura inferior, no entanto, seria necessário avaliar como afetaria as outras propriedades.

O mesmo estudo foi realizado para as restantes membranas, tendo-se verificado nas membranas contendo sulfato de condroitina e fucoidano que a espessura obtida para uma deposição de 8 mL era de (44 ± 12) µm, sendo que a membrana se tornava mais frágil, quebrando com mais facilidade, pelo que nestas membranas se optou por um volume de deposição de 10 mL. Deste modo a espessura manteve-se semelhante à de CH-SiO₂, bem como a massa por membrana (Tabela 15), não prejudicando, também, as propriedades mecânicas.

Tabela 15 - Resumo de espessuras e massas de cada membrana de acordo com o volume de deposição

Membrana	Volume de deposição/ mL	Espessura/ μm	Massa da membrana/ g
CH-SiO ₂ NIM	8	(51 $\pm$ 10)	0,31 – 0,32
CH-SiO ₂ MIM	8	(58 $\pm$ 9)	0,33 - 0,34
CH-CS NIM	10	(57 $\pm$ 11)	0,32 – 0,33
CH-CS MIM	10	(58 $\pm$ 7)	0,32 – 0,33
CH-Fd NIM	10	(60 $\pm$ 8)	0,31 – 0,32
CH-Fd MIM	10	(58 $\pm$ 7)	0,31 – 0,32

A obtenção de membranas com características desejáveis foi uma tarefa difícil, tendo sido necessário ajustar diversos parâmetros à medida que se encontravam diferentes obstáculos.

4.2. Caracterização das membranas

Neste ponto, foi realizada a caracterização das membranas, essencialmente visando a sua composição química.

Avaliação da composição das membranas por FTIR

Utilizando o equipamento e parâmetros descritos no ponto 2.1.3., procedeu-se à utilização da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada com o módulo de ATR – refletância total atenuada, para a avaliação da composição das membranas sintetizadas.

Para determinar a presença dos componentes esperados nas membranas obtidas, foram realizados espectros de FTIR para esses componentes individuais, nomeadamente, CH, CS, Fd e para o gel formado apenas por TEOS (SiO₂) (Figura 26) e para o glicerol (Figura 27), como referência para a interpretação dos espectros das membranas.

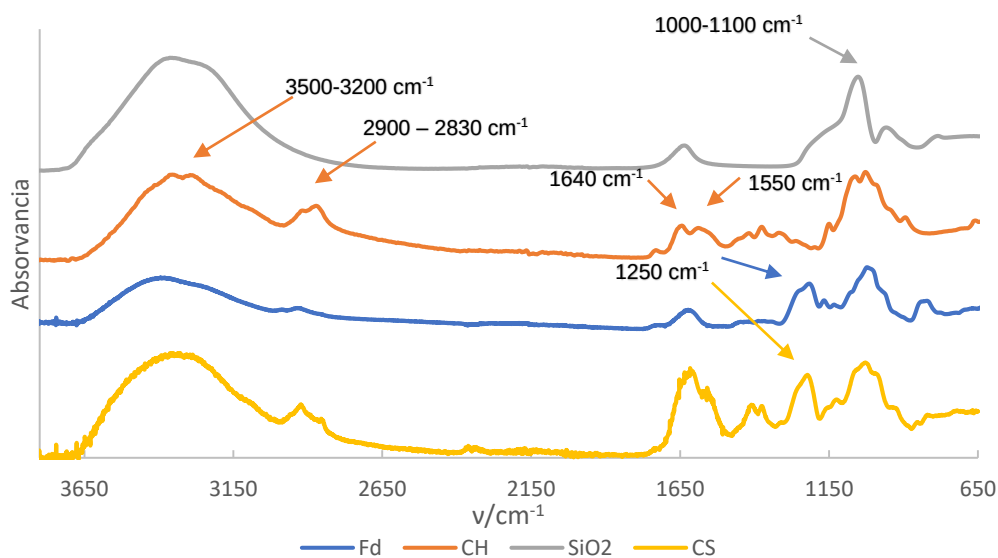


Figura 26 - Espetros de FTIR para os componentes individuais CH, CS, Fd e SiO₂ e principais bandas assinalados

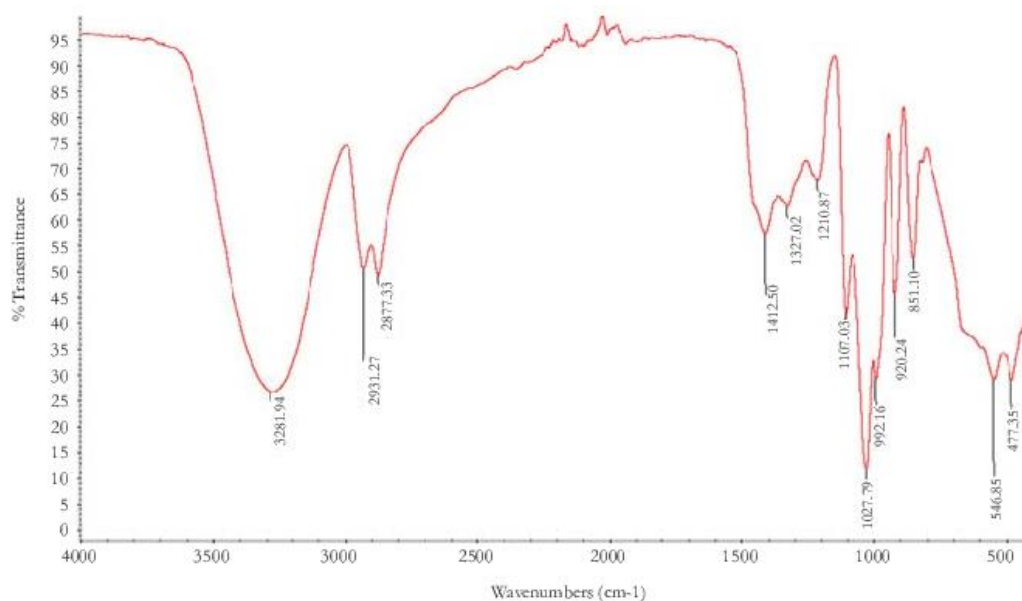


Figura 27 - Espetro de FTIR do glicerol retirado de [96]

Pela análise da Figura 26 é possível fazer uma relação dos valores das bandas mais intensas com os grupos funcionais principais dos componentes (Tabela 16), que serão essenciais para identificar a presença destes compostos no material sintetizado.

Tabela 16 - Ligações principais dos diferentes componentes e respectivas frequências de vibração

Ligação	ν/cm^{-1}
C=O do grupo amida de CS/ Fd	1590-1630
C-O-C do grupo carboxilo de CS e Fd	1420 e 1380
S=O do grupo sulfato de CS e Fd	1200-1300
C-N do grupo amida de CS	1550
C=O (amida I) de CH	1640
N-H- (amida II) de CH	1533
Si-O-Si da Sílica	1000-1100

Na Figura 26 podemos observar que no espectro infravermelho do quitosano, sulfato de condroitina e fucoidano, existem bandas em torno de 2900 e 2830 cm^{-1} , que podem ser atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico de C-H, respetivamente, pelo que não está presente no espectro da sílica [97]. Estes polissacarídeos possuem também uma banda de absorção a 1153 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento assimétrico da ponte C-O-C. No caso do quitosano, este possui duas bandas muito características, nomeadamente a 1640 e 1550 cm^{-1} , devido às vibrações de estiramento de C=O do grupo amida I e vibração de deformação do grupo amida II, respetivamente [97, 98]. O sulfato de condroitina e fucoidano, por possuírem grupos sulfato, apresentam a banda característica deste grupo funcional a cerca de 1250 cm^{-1} [99, 100]. É possível distinguir estes polissacarídeos sulfatados entre si, devido à presença de ligações C-N do sulfato de condroitina, o que se traduz numa banda a cerca de 1550 cm^{-1} [100].

A sílica apresenta uma banda larga na gama dos 3500-3200 cm^{-1} , tal como ocorre nos outros polímeros, devido às vibrações das ligações O-H, bem como uma banda característica muito intensa a cerca de 1100 cm^{-1} , devido às vibrações de estiramento Si-O-Si [101].

O espectro de FTIR do glicerol (Figura 27) apresenta vibrações de O-H a 3265 cm^{-1} , enquanto C-H apresenta bandas características na região de 2810-2950 cm^{-1} . Também foi observada deformação angular do grupo C-O-H na região de 1400 a 1420 cm^{-1} , e de estiramento do C-O do álcool primário a 1112 cm^{-1} [96].

Por análise comparativa dos espectros das Figuras 26 e 27 com os espectros das membranas (Figura 28) é possível verificar a presença dos componentes, através da presença dos grupos funcionais que lhes são respetivos.

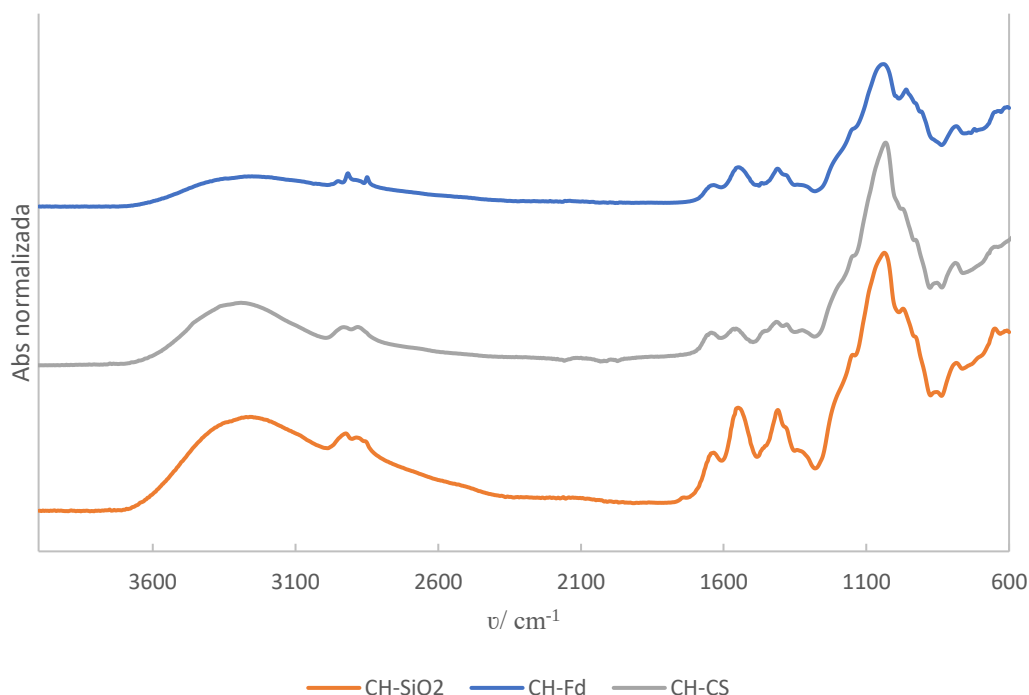


Figura 28 - Espectros de IV para os materiais não impressos

Através da representação gráfica dos espectros das membranas (Figura 28) é possível verificar a presença da sílica a 1035 cm^{-1} e do CH pelas bandas dos grupos amida a 1640 e 1550 cm^{-1} . Não é possível uma boa identificação da CS e Fd, uma vez que as suas bandas estão sobrepostas e devido à sua %mássica teórica ser reduzida relativamente à dos outros constituintes o que provoca bandas pouco intensas. O sulfato de condroitina e fucoidano representam apenas 2,3 % da massa da respetiva membrana. O mesmo acontece com o glutaraldeído, que representa uma percentagem de apenas 0,5 % na membrana de CH-SiO₂ e 0,7 % nas restantes membranas, tornando-se impercetível. No caso do glicerol, embora, este já represente uma percentagem perto dos 20 % da massa das membranas, o que já é considerável, apresenta bandas na mesma região da sílica e quitosano, que possuem bandas de intensidade superior devido a serem os maiores constituintes das membranas, por exemplo no caso da membrana CH-SiO₂, quitosano representa 42 %, enquanto a sílica 30 % da massa da membrana.

Os máximos das bandas apresentam, em geral, um pequeno desvio do número de onda, relativamente aos compostos individuais. Como não estamos perante a

substância pura e sim uma mistura com diversos componentes, as interações afetam os modos vibracionais, e logo o número de onda onde ocorre o pico.

Os espectros de infravermelho das membranas molecularmente impressas apresentam as bandas característicos presentes nas membranas não impressas. (Figura 29 a 31), embora com pequenas diferenças nas proporções dos máximos das bandas.

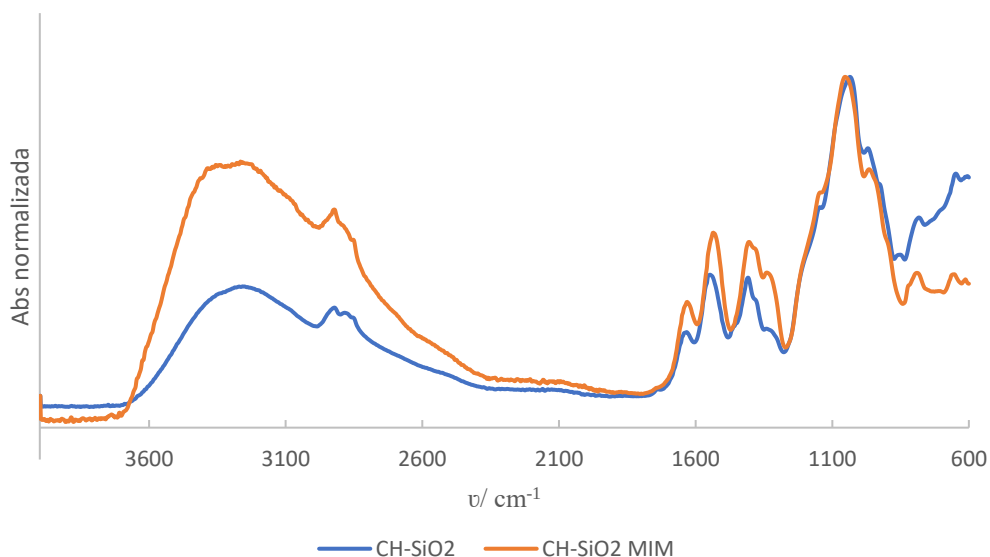


Figura 29 - Representação gráfica dos espectros normalizados de FTIR de CH-SiO₂ NIM e MIM

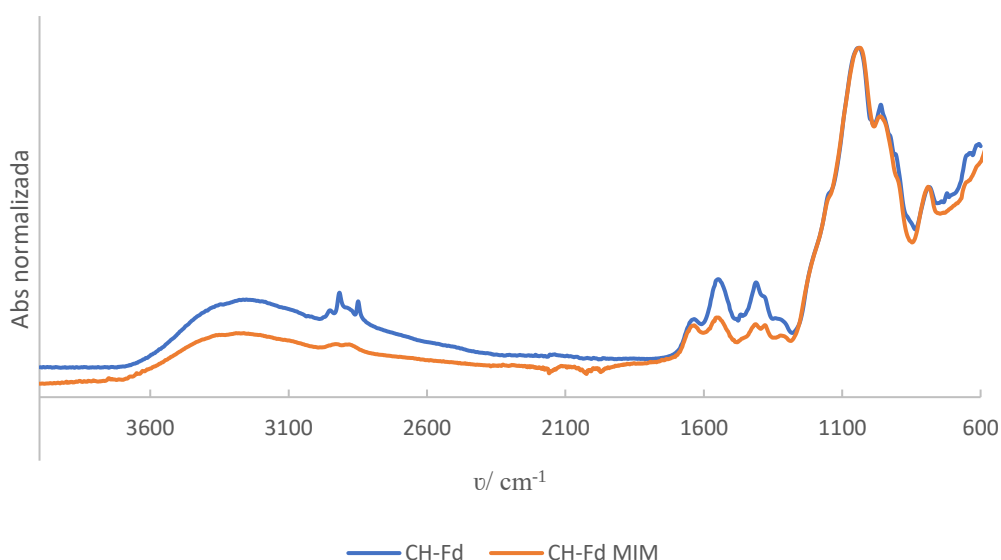


Figura 30 - Representação gráfica dos espectros normalizados de FTIR de CH-Fd NIM e MIM

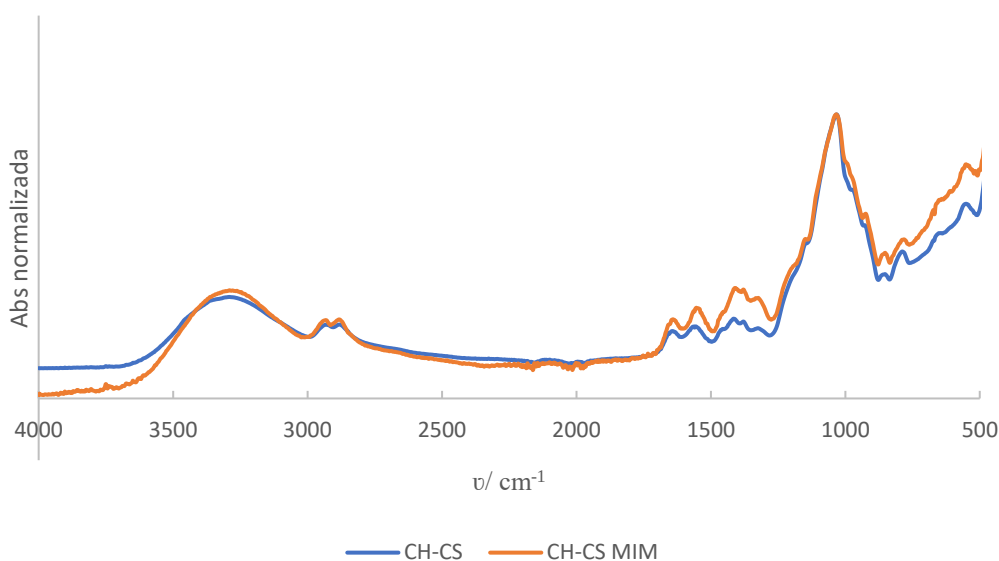


Figura 31 - Representação gráfica dos espectros normalizados de FTIR de CH-CS NIM e MIM

Tal como já referido, as membranas molecularmente impressas, aparentam através da análise de FTIR conter a mesma composição que as membranas análogas, uma vez que as bandas características dos componentes reconhecidos para as membranas não-impressas são os mesmos presentes nos MIM. Existem ligeiras diferenças nas proporções dos máximos das bandas, especialmente na região dos 1400 a 1200 cm^{-1} , algo possível devido à alteração estrutural provocada pelo chumbo, que pode traduzir-se numa alteração nos modos vibracionais, mas requereria um estudo mais aprofundado de forma a esclarecer cabalmente este ponto.

Avaliação da composição das membranas por TGA

Como modo de complementar a avaliação da composição, mais em específico a presença dos biopolímeros sulfatados recorreu-se a uma segunda técnica, nomeadamente a Termogravimetria. Foi possível obter as curvas termogravimétricas para as diferentes membranas sem a adição do glicerol, uma vez que este é um componente que em % de massa teórica representa cerca de 20 % das membranas, e com ponto de ebulição de 290 $^{\circ}\text{C}$ poderia encobrir a presença dos outros biopolímero que apenas estão em % mássica de 2,3 %. O procedimento e parâmetros estão descritos em 2.1.

Na Figura 32 estão presentes os gráficos de TGA para o NIM e MIM de CH- SiO₂, bem como o dos componentes individuais principais, quitosano e sílica, que representam 42 e 30 %, respetivamente, da percentagem mássica teórica do total da membrana.

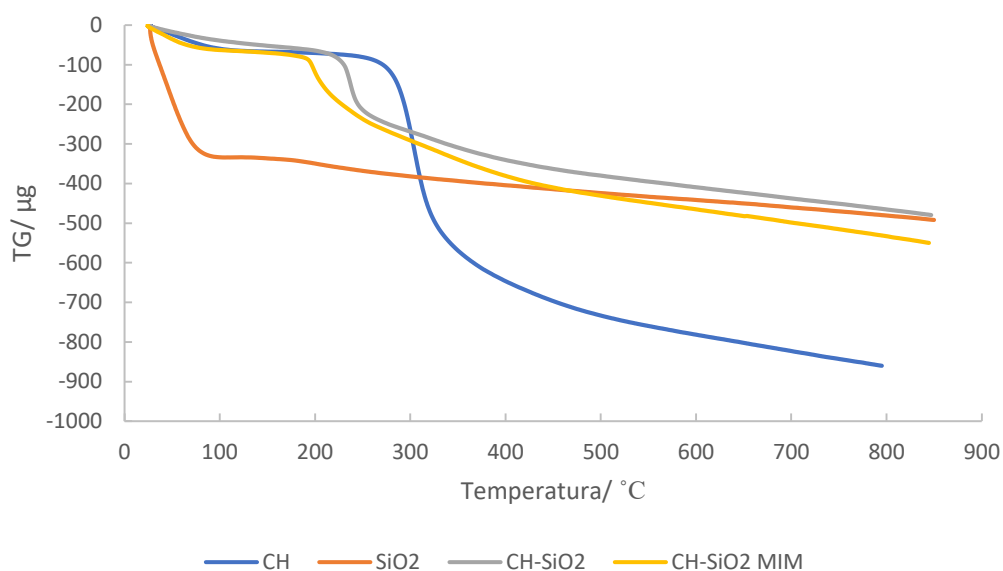


Figura 32 - Representação gráfica de curva TG de CH- SiO₂ e seus componentes

A análise é mais fácil de interpretar utilizando os gráficos de DTG (Figura 33), que permitem uma melhor identificação dos pontos de inflexão. Devido a haver variações nas massas utilizadas para determinar cada TG/DTG dos diferentes componentes e membranas, os gráficos DTG encontram-se normalizados.

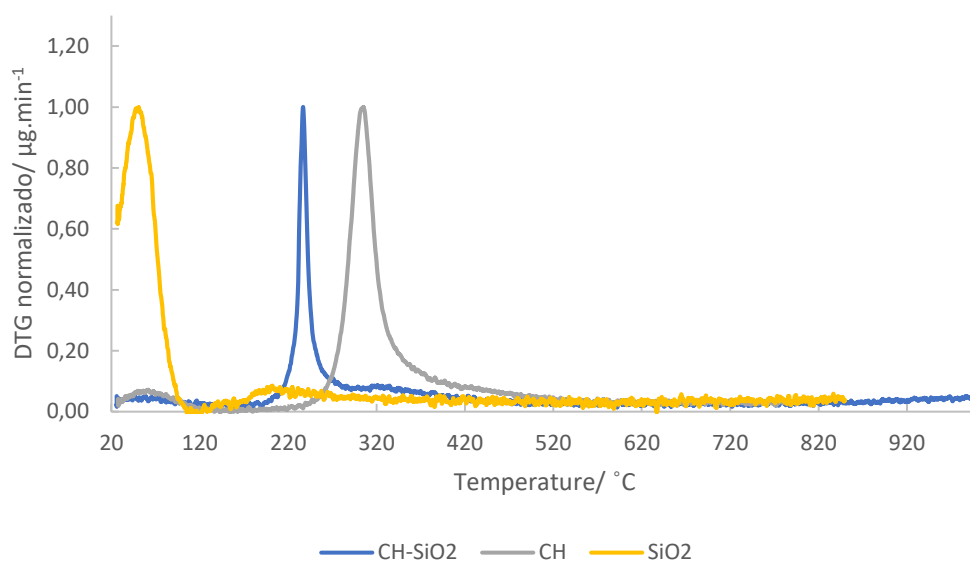


Figura 33 - Representação dos gráficos de DTG de CH-SiO₂ e seus constituintes

Analisando os gráficos, é necessário ter sempre em conta a perda inicial entre os 20 e 120 °C, que corresponde à perda de água. Tal como esperado, não se verifica degradação da sílica no intervalo de temperaturas analisado, uma vez que esta só se degrada a partir dos 1000 °C [102]. No entanto o quitosano quando incorporado na membrana, torna-se termicamente mais instável começando a degradar-se a uma temperatura mais baixa, cerca de 230 °C, comparativamente ao biopolímero no seu estado puro, que se degrada aos 300 °C.

Na literatura é referido que de 30 a 150 °C ocorre desidratação, enquanto acerca de 330 °C ocorre um máximo de perda de massa correspondente ao quitosano [103]. O valor obtido difere um pouco do da literatura, algo possível devido a diferentes métodos de extração do quitosano e diferentes graus de pureza.

No que se relaciona à comparação entre o NIM e MIM (Figura 34), verifica-se que a membrana impressa apresenta uma maior instabilidade térmica que o seu respetivo NIM, uma vez que se degrada mais cedo, aos 200 °C. Tal pode dever-se à alteração na estrutura da membrana, uma vez que o catião chumbo sacrifica alguns grupos passíveis de formar ligações e interagir com outras cadeias, que permitiriam uma estrutura mais coesa da rede biopolimérica.

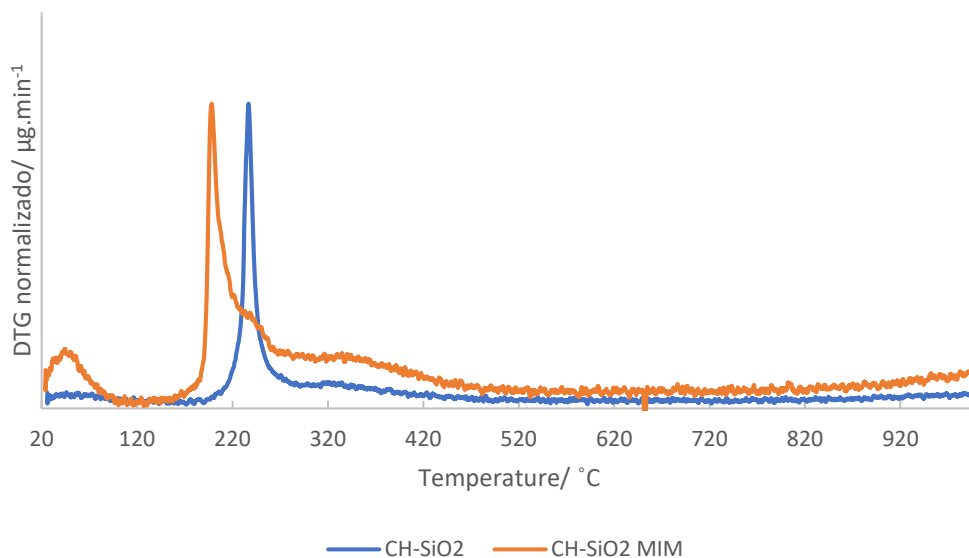


Figura 34 - Representação dos gráficos de DTG de CH-SiO₂ NIM e MIM

Os grandes constituintes desta membrana são o quitosano e a sílica, deste modo, e verificando pela Figura 33, que apenas o quitosano é degradado no intervalo de temperaturas escolhidas (30 - 1000 °C) é possível quantificar através do sistema de equações (10), a percentagem destes dois componentes, de acordo com o descrito em 2.1.3.

Através deste método foi possível determinar que a membrana era constituída por cerca de 60 % de quitosano e 40 % de sílica, quer para o NIM, quer para o MIM. Segundo os valores de percentagem mássica teórica, para esta membrana, seria esperado 42 % e 30 %, de quitosano e sílica, respetivamente, mas tendo em conta os restantes componentes, que constituem 28 % da membrana. No entanto, fazendo as razões das percentagens obtidas, verifica-se que existe a mesma proporção entre ambas, ou seja, o quitosano está em uma quantidade 1,5 vezes superior à sílica.

No caso da membrana de CH-CS, segundo os gráficos de TG (Figura 35), é possível verificar pequenas diferenças entre os diferentes componentes. O sulfato de condroitina começa a degradar a temperaturas um pouco mais baixas que o quitosano.

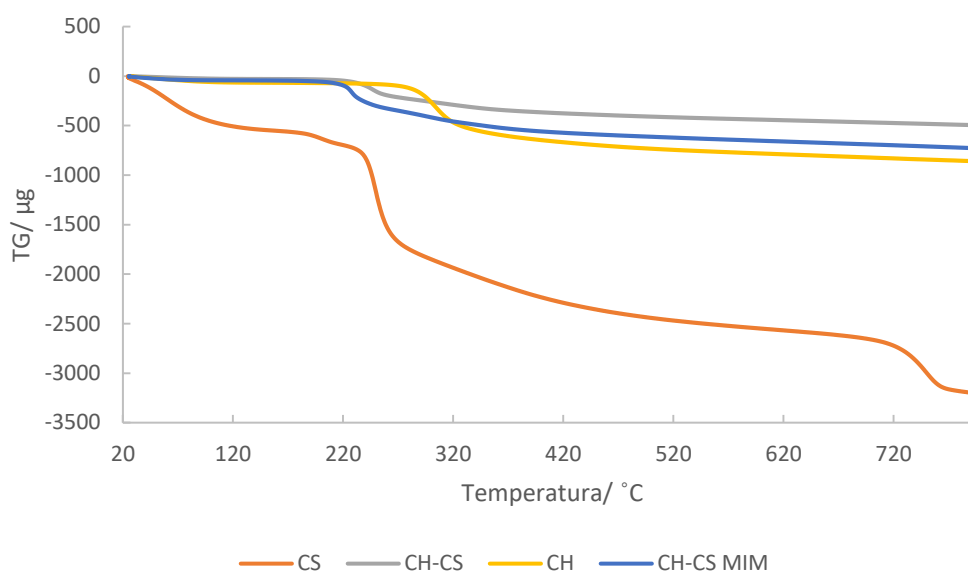


Figura 35 - Gráficos de TG de CH-CS e seus componentes

Analisando os gráficos de DTG (Figura 36), é possível identificar a degradação do sulfato de condroitina a temperaturas perto dos 240 °C enquanto o quitosano se degrada a 300 °C. Algo que pode ser corroborado pela comparação com os TG e DTG dos componentes individuais e através da literatura [103 – 105]. De acordo com a literatura, entre os 20 e 170 °C ocorre perda de massa associada à desidratação, com o máximo a cerca de 65 °C. De 170 a 286 °C ocorre uma perda de massa com um pico de degradação associada a cerca de 250 °C, para o sulfato de condroitina, o que vai de encontro aos valores obtidos. Por fim, de 286 a 346 °C com máximo de degradação a 318 °C ocorre a redução da estabilidade térmica da CS devido à libertação de grupos sulfato e ácido carboxílico [104, 105]. Para o quitosano os valores da literatura já foram supra referenciados, sendo que este biopolímero é um pouco mais termicamente estável que o sulfato de condroitina, pelo que tem um pico de degradação a temperaturas superiores.

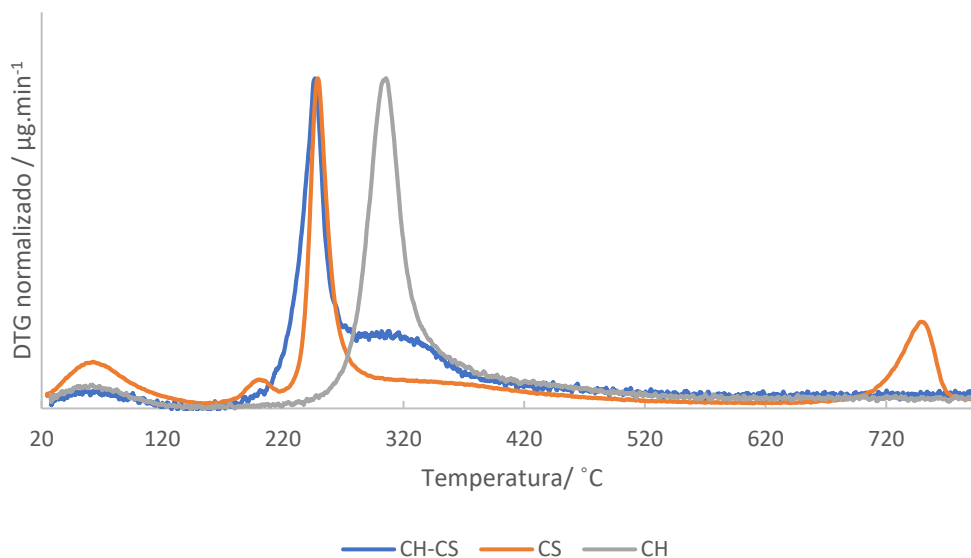


Figura 36 - Gráficos de DTG de CH-CS e seus componentes

Existe uma sobreposição entre a gama de temperaturas a que ocorre a degradação do quitosano e a degradação do sulfato de condroitina, o que impossibilita a quantificação dos biopolímeros individuais. De acordo com os valores de %mássica teórica, seria esperado 34 % quitosano e apenas 2,3 % de sulfato de condroitina, o que leva a querer que existe um desvio, essencialmente, do pico correspondente à perda de quitosano, para temperaturas inferiores, sobrepondo-se com o pico de sulfato de condroitina. No entanto comparando com o DTG da membrana CH-SiO₂ que é similar, com exceção da ausência de sulfato de condroitina, é possível verificar pequenas diferenças, nomeadamente um pequeno pico de degradação a cerca de 320 °C, algo que não está presente na membrana de CH-SiO₂, o que leva a querer que se deve à diferença na composição.

Comparando os gráficos de DTG da membrana com e sem impressão (Figura 37) é possível verificar que existe uma pequena variação na temperatura a que ocorre a degradação dos biopolímeros, para temperaturas mais baixas, havendo uma diferença de 20 °C (227 °C em vez dos 247 °C).

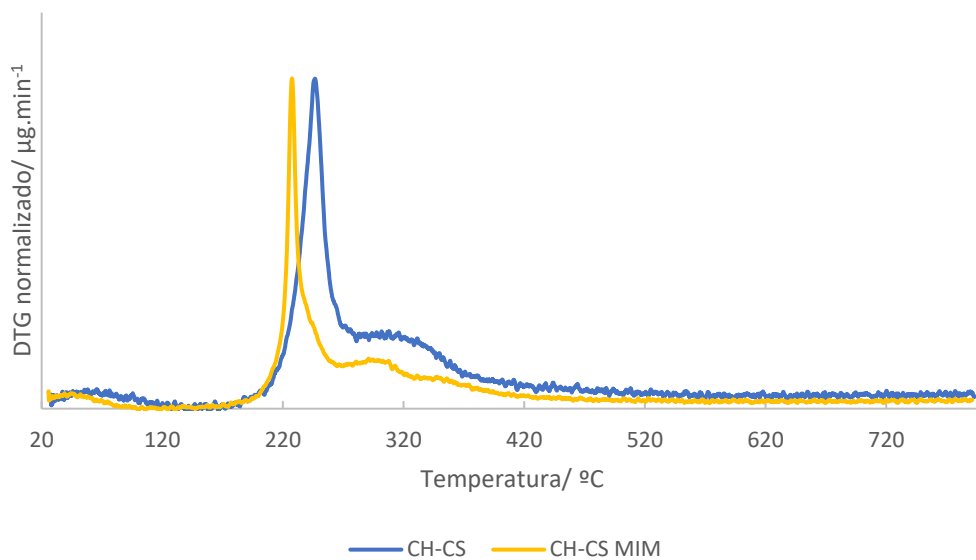


Figura 37 - Gráficos DTG de CH-CS NIM e MIM

Por fim, a mesma análise foi realizada para as membranas de CH-Fd, tendo-se obtido as curvas de TG (Figura 38).

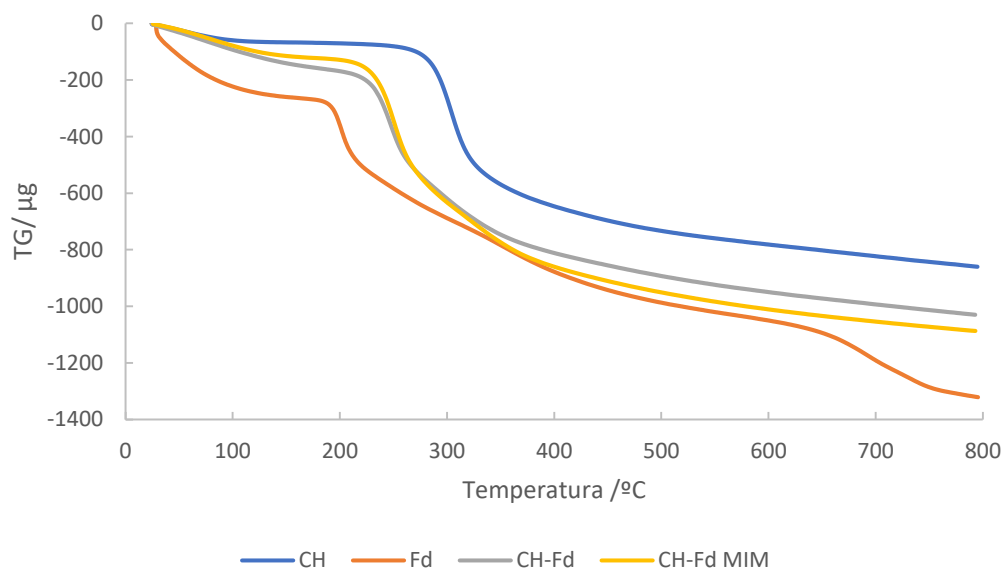


Figura 38 - Gráficos de TG de CH-Fd e seus componentes

Novamente, utilizando os gráficos de DTG (Figura 39) é possível determinar melhor a degradação de cada componente. De acordo com estudos já realizados e similarmente ao que acontece nos casos anteriores, entre os 25 e 130 °C espera-se que ocorra a desidratação e em seguida dos 210 a 490 °C ocorre a pirólise [106], valores consistentes com os valores obtidos.

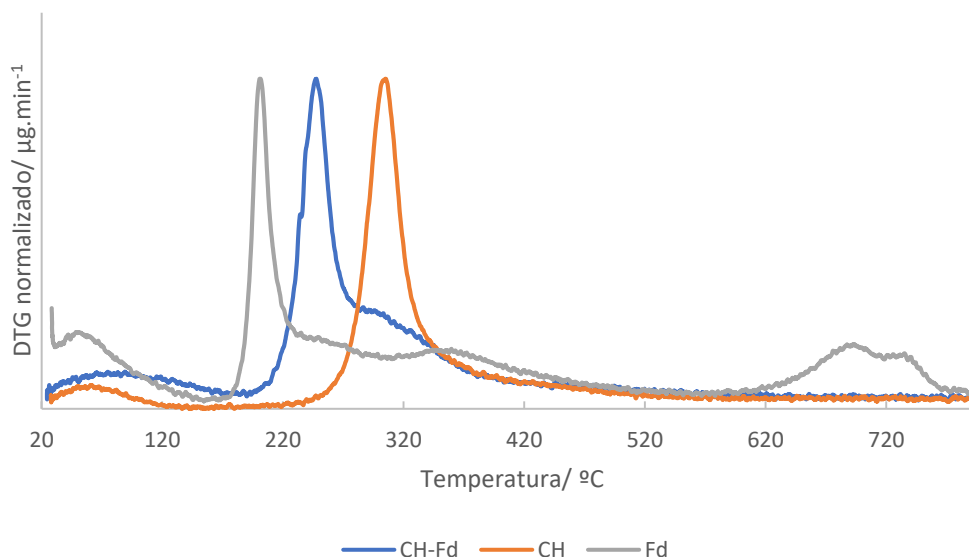


Figura 39 - Gráficos de DTG de CH-Fd e seus componentes

Tal como ocorreu para a membrana de CH-CS, nesta também existe sobreposição das gamas das temperaturas a que ocorre a degradação dos dois biopolímeros, não sendo possível a sua quantificação, embora iniciem a degradação a temperaturas diferentes, nomeadamente 200 °C e 305 °C, para o fucoidano e quitosano, respetivamente. Para além de que é esperado na membrana uma percentagem mássica muito pequena de fucoidano, apenas 2,3 %, o que pode ficar mascarado pelo pico de degradação do quitosano que representa, teoricamente, 34 %. Através da Figura 40, é possível notar, tal como ocorreu com CH-CS que o biopolímero quitosano se degrada mais facilmente na membrana, aos 240 °C, do que no seu estado puro, uma vez que esse pico de degradação da membrana é associado ao quitosano devido à quantidade muito superior deste biopolímero, comparativamente à do fucoidano.

Por comparação entre as membranas análogas NIM e MIM estas não revelaram grande alteração no gráfico de TG / DTG (Figura 40).

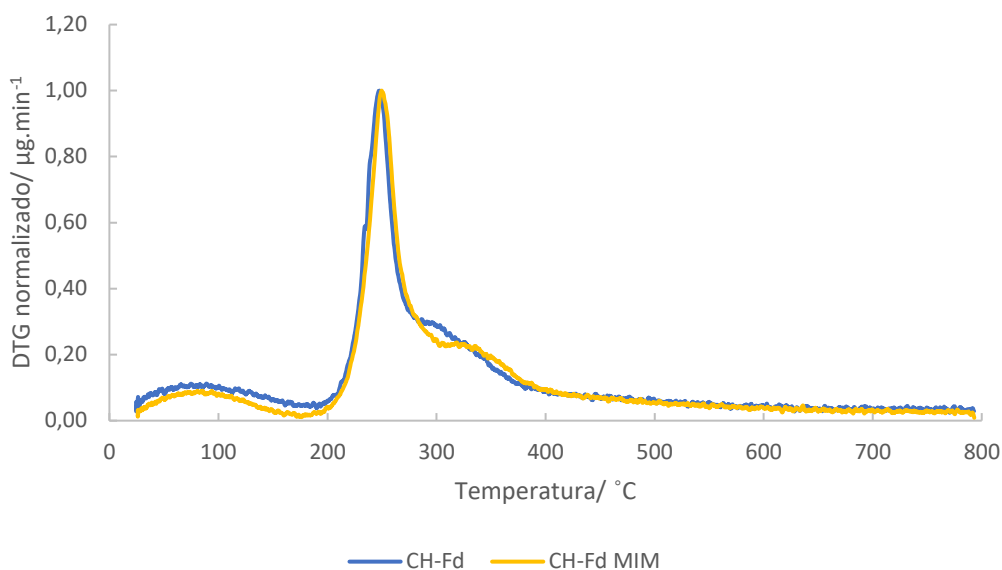


Figura 40 - Gráficos de DTG de CH-Fd NIM e MIM

4.3. Desenvolvimento de membranas sensoras para Pb(II)

Para obter uma membrana sensora recorreu-se à incorporação de um cromóforo na membrana. O cromóforo é essencial para quando da ligação com o analito haja alteração de cor, que irá permitir uma determinação ótica da presença do analito no meio a analisar. A escolha do cromóforo foi realizada tendo em conta o analito de interesse, o catião chumbo, procurando uma espécie que complexasse com este catião e provocasse alterações a nível ótico na membrana. Selecionou-se a ditizona que já foi aplicada em membranas óticas [31, 64].

Para obter uma boa sensibilidade, neste caso para o catião metálico de interesse – catião chumbo – foram realizados diversos testes, nomeadamente, testadas diferentes concentrações do cromóforo a incorporar na membrana, diversos tempos de imersão no cromóforo e diversos tempos de imersão na solução a analisar de modo a melhorar o sinal obtido.

A incorporação da ditizona foi inicialmente testada através da adição de uma solução etanólica de ditizona diretamente durante a síntese da membrana, mas uma vez que esta não se dissolve em água, precipitou quando entrou em contacto com uma elevada proporção de água. Como consequente, a incorporação desta foi realizada através da imersão da membrana numa solução etanólica de ditizona. No entanto este procedimento teve dois problemas, o primeiro está relacionado com a rigidez. Por

observação, verificou-se que a membrana imersa na solução de etanol tornou-a mais rígida, algo possível devido a diminuir o grau de inchamento necessário da membrana ou a remoção do glicerol pelo etanol. O segundo problema deve-se à necessidade de um passo adicional, nomeadamente da membrana estar previamente mergulhada em água, pois testou-se a imersão da membrana seca e inchada na solução etanólica e verificou-se que após as membranas ficarem mergulhadas durante 3 h numa solução etanólica de $0,5 \text{ mmol.dm}^{-3}$, a membrana que tinha sido previamente imersa em água, conseguiu obter uma maior homogeneidade e maior incorporação deste composto na membrana, algo visível através da cor obtida (Figura 41).

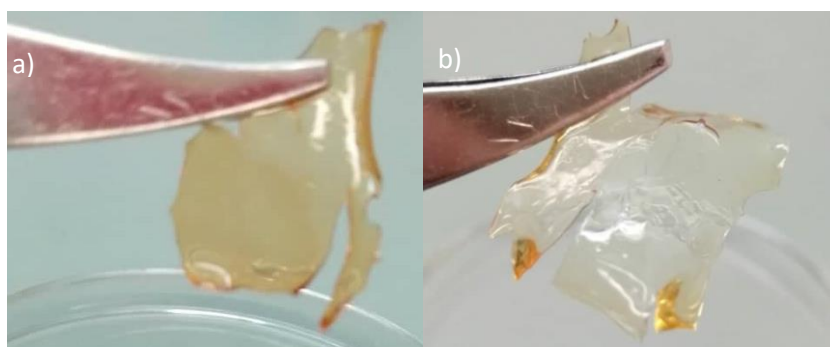


Figura 41 - Membrana CH-Fd previamente deixada em água desionizada a) e não deixada b)

Por fim, decidiu-se incorporar ditizona a partir de uma solução em DMSO:Água (70:30). Deste modo foi possível dissolver a ditizona, sem comprometer as propriedades mecânicas da membrana.

A impregnação da ditizona foi então realizada, ainda de modo inicial, para identificar a banda na membrana que pertence à incorporação da ditizona (Figura 42), através da imersão de 10 mg em 10 mL de ditizona $0,5 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em DMSO:Água (70:30).

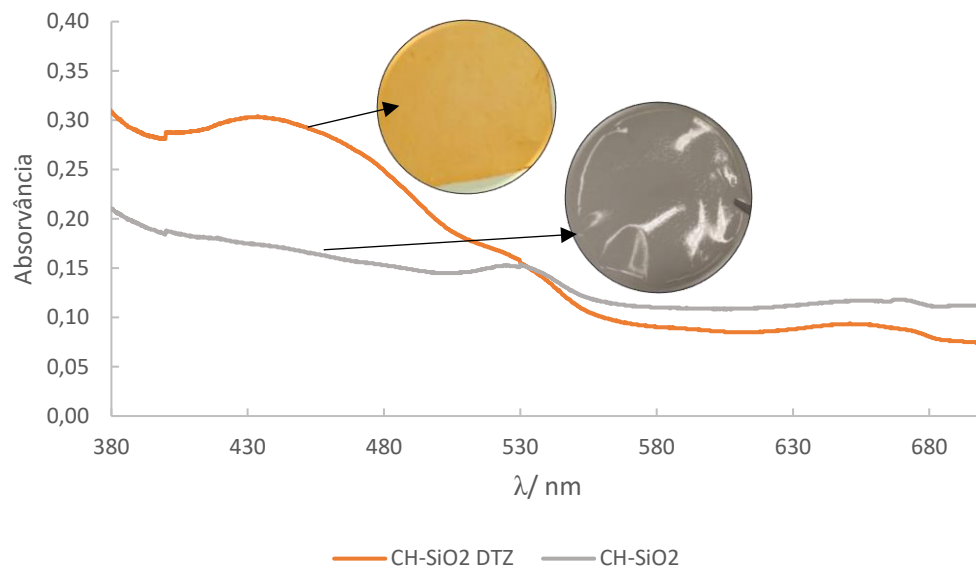


Figura 42 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para CH-SiO₂ sem e com ditizona

Pela análise da Figura 42, é possível verificar que a cor laranja que a membrana obtém quando incorpora a ditizona se traduz no surgimento de uma banda a 460 nm, tal como esperado [69].

Impregnação da ditizona na membrana – imersão em glutaraldeído

O próximo passo foi realizado para garantir que existem grupos de glutaraldeído ligados a quitosano expostos para posterior ligação à ditizona, uma vez que se supõe que a ligação se realiza de acordo com o esquema representado na Figura 43 [107].

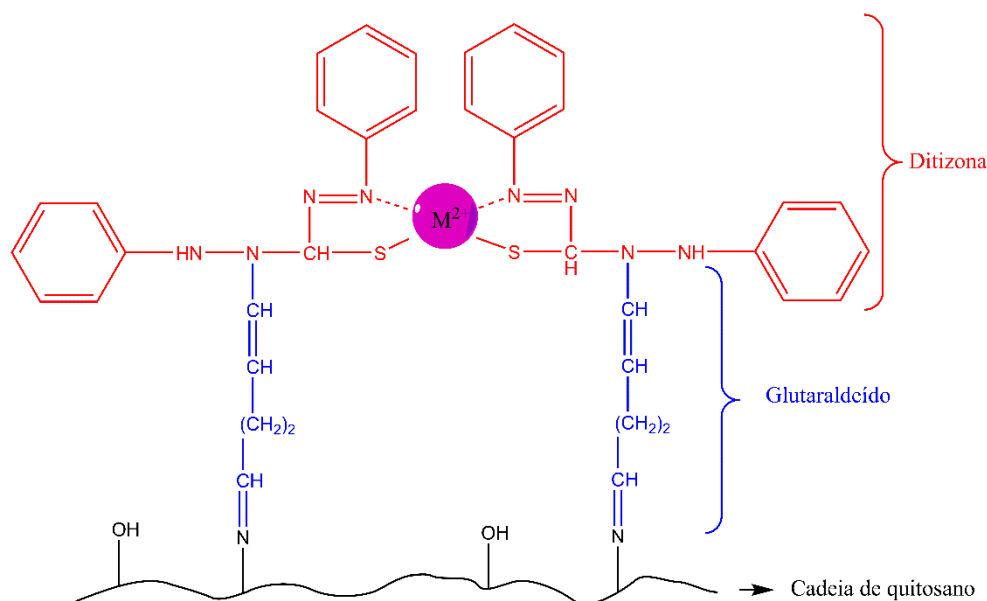


Figura 43 - Esquema de ligação da ditizona à membrana adaptado de [107]

De acordo com o esperado, foi testada a imersão da membrana CH-SiO₂, antes da imersão em ditizona, numa solução de glutaraldeído, uma vez que o glutaraldeído presente na síntese da membrana não estará todo disponível para formar ligações, devido a ser utilizado para a reticulação entre cadeias biopoliméricas e o remanescente possivelmente ter sido removido nas lavagens. Foram testadas diversas concentrações de solução de glutaraldeído onde a membrana seria imersa (Tabela 17).

Tabela 17 - Efeito das diferentes concentrações de glutaraldeído na impregnação da ditizona e propriedades mecânicas da membrana

[Glut]/ % (v/v)	Efeito na impregnação da ditizona	Efeito nas propriedades mecânicas
0,5	Melhora a uniformidade da cor	Diminui maleabilidade
0,25	Melhora a uniformidade da cor	Diminui maleabilidade
0,05	Melhora a uniformidade da cor	Diminui maleabilidade
0,025	Melhora a uniformidade da cor	Mantem a maleabilidade

Começou-se por imergir a membrana numa solução de 0,5 % (v/v) de glutaraldeído, e embora, tenha provocado o efeito pretendido de melhorar a incorporação da membrana, o que se traduziu numa cor mais intensa e mais uniforme, tornou a membrana menos maleável. Devido, potencialmente ao glutaraldeído funcionar como

agente reticulante adicional, para além de ser a ponte de ligação entre o quitosano e a ditizona, o seu excesso provoca um aumento da rigidez, e subsequente perda de maleabilidade da membrana, pois deve aumentar o número de reticulações entre cadeias de quitosano. Reduziu-se gradualmente a concentração da solução, até obter o efeito pretendido, sem comprometer a maleabilidade da membrana, tendo-se chegado à concentração de 0,025 %.

Na Figura 44 é possível ver a diferença na impregnação da ditizona causada pela imersão em glutaraldeído.

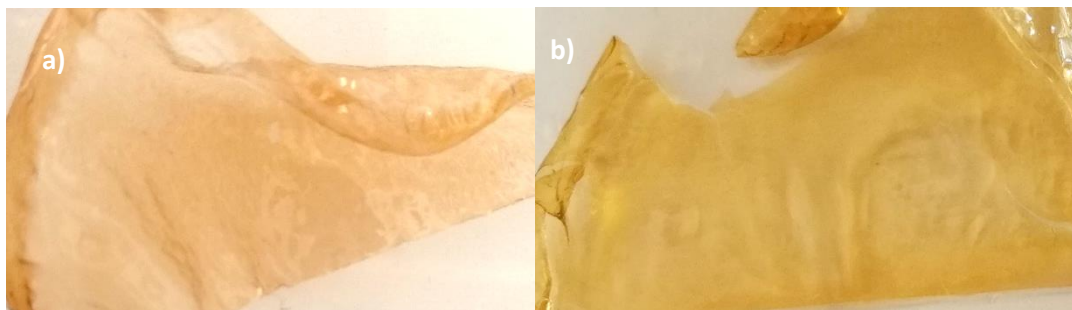


Figura 44 - Membrana CH-SiO₂ sem imersão em glutaraldeído a), e com imersão b)

Existe uma melhor uniformidade na distribuição da ditizona pela membrana, bem como uma intensificação da cor, visível através da espectroscopia de UV-Vis (Figura 45).

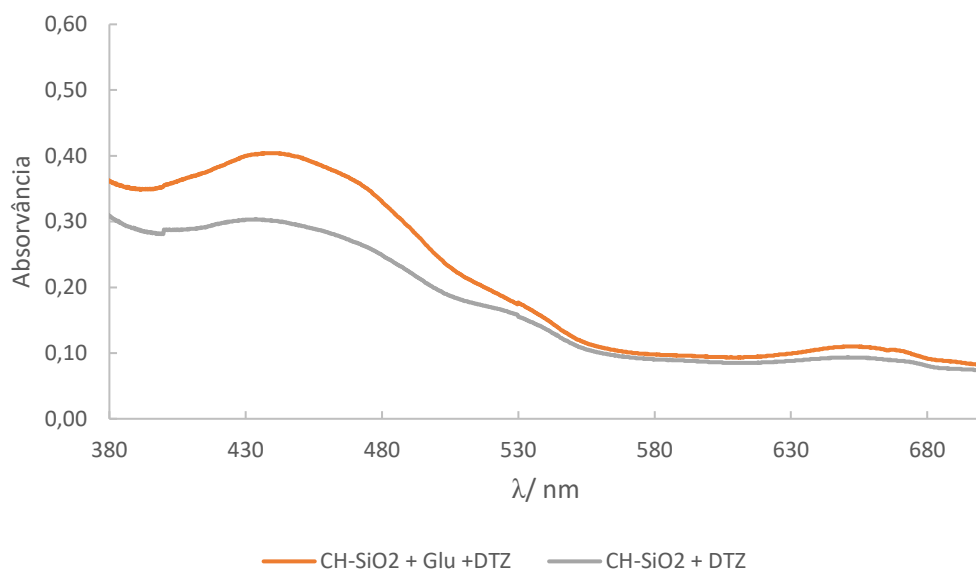


Figura 45 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis das membranas de CH-SiO₂ com ditizona com e sem imersão prévia em glutaraldeído

Por análise das alterações provocadas à membrana e anteriormente apresentadas, a solução de glutaraldeído escolhida foi a de 0,025 %.

Otimização da concentração de ditizona

Para otimizar a concentração de ditizona a utilizar, seguiu-se o procedimento descrito no ponto 2.3. para a membrana de CH-SiO₂, tendo sido aplicados os resultados às restantes membranas. Testou-se a imersão das membranas em 4 concentrações diferentes de ditizona, por um período de 5 h, tendo sido obtidos os seguintes espectros de UV-Vis (Figura 46), em que a linha de base considerada foi a solução tampão ácido acético / acetato de sódio 2 mmol.dm⁻³ a pH 5,5.

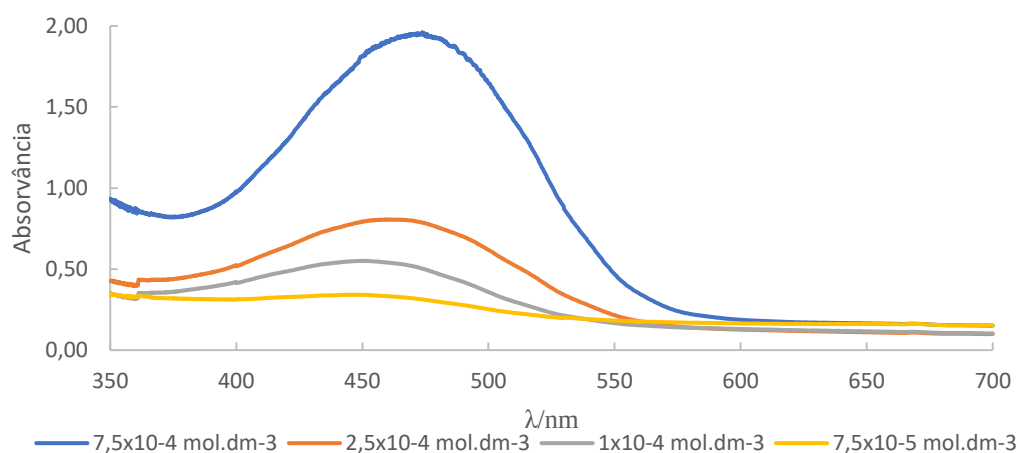


Figura 46 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membranas imergidas em soluções com diferentes concentrações de ditizona

Na Figura 46 verificar a presença de uma banda a cerca dos 460 nm correspondente à ditizona na membrana, que apresenta uma maior intensidade quanto maior a concentração de ditizona utilizada para a imersão da membrana.

Para determinar o sinal das membranas imersas em diferentes concentrações de ditizona, foram então imersas por 2 min numa solução de 10 ppm de Pb(II), como já descrito. Os espectros obtidos estão representados na Figura 47. Nestes espectros a linha de base foi realizada com a respetiva membrana antes da imersão na solução de Pb(II).

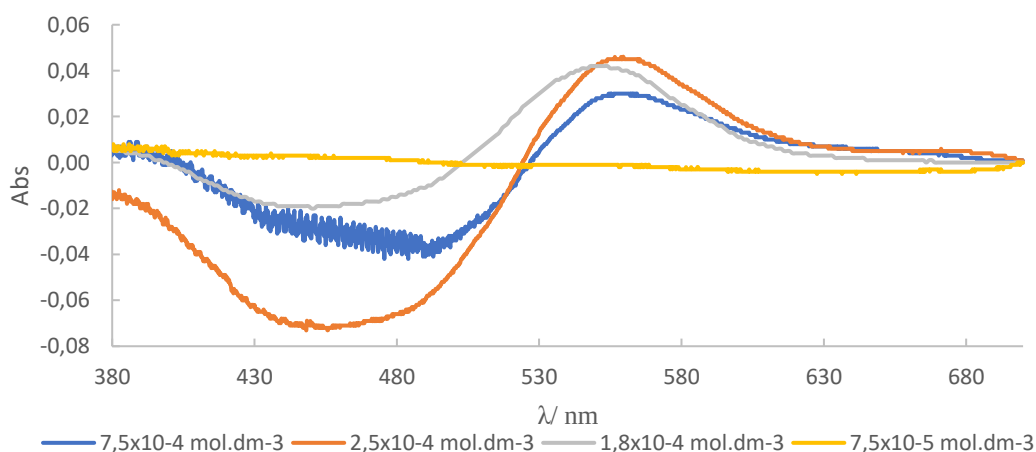


Figura 47 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membranas imergidas em soluções com diferentes concentrações de ditizona e posterior imersão em 10 ppm de Pb(II)

A análise dos valores obtidos foi realizada tendo em conta o máximo de absorvância e a área da banda a cerca de 550 nm, correspondente ao complexo ditizona-Pb(II), o decréscimo de absorvância e área correspondentes à perda de intensidade a 460 nm, devido à ditizona na membrana não complexada, justificada pela alteração da cor (Figura 48). O decréscimo da banda a 460 nm e o aumento da banda a 550 nm é justificado pela complexação da ditizona, pelo que reduz a quantidade de ditizona por complexar, o que se traduz na redução da sua banda característica e consequente aumento da banda referente à ditizona complexada com catião chumbo.

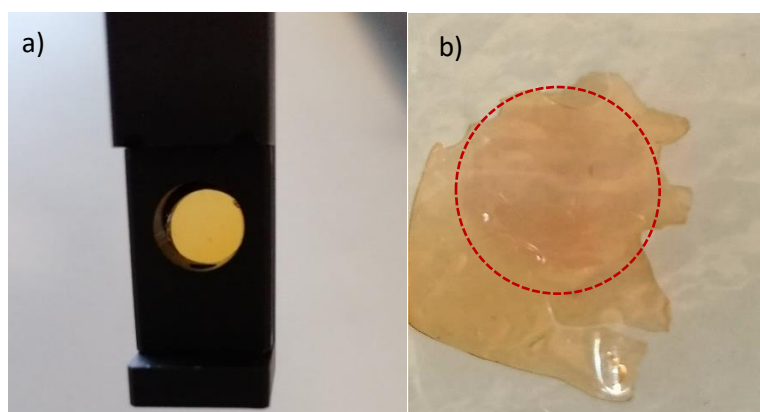


Figura 48 - Membrana na cuvete antes da imersão em solução de catião chumbo a) e após a imersão b) (alteração no centro onde esteve em contacto com a solução, passando de laranja para um tom rosa muito subtil).

Através do método descrito no ponto 2.2.3. foi possível obter os seguintes gráficos (Figura 49 e 50).

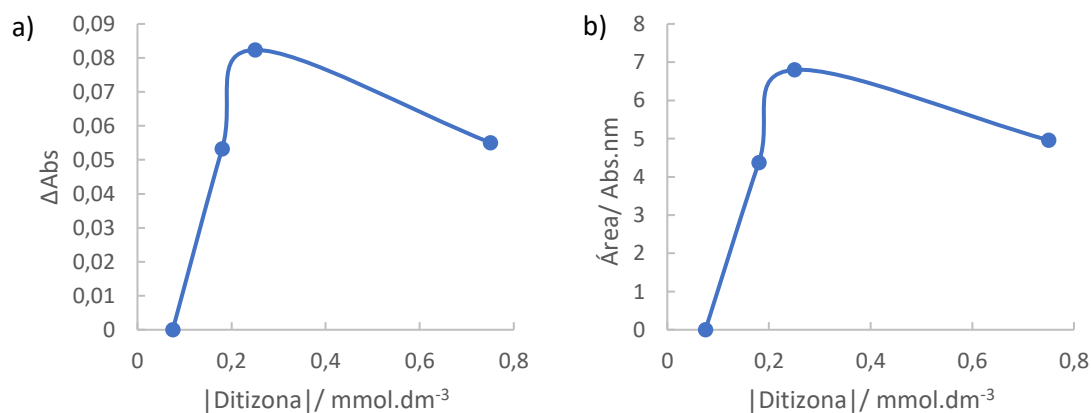


Figura 49 - Variação da absorvância máxima a) e área b) da banda a 550 nm, em função da concentração de ditizona

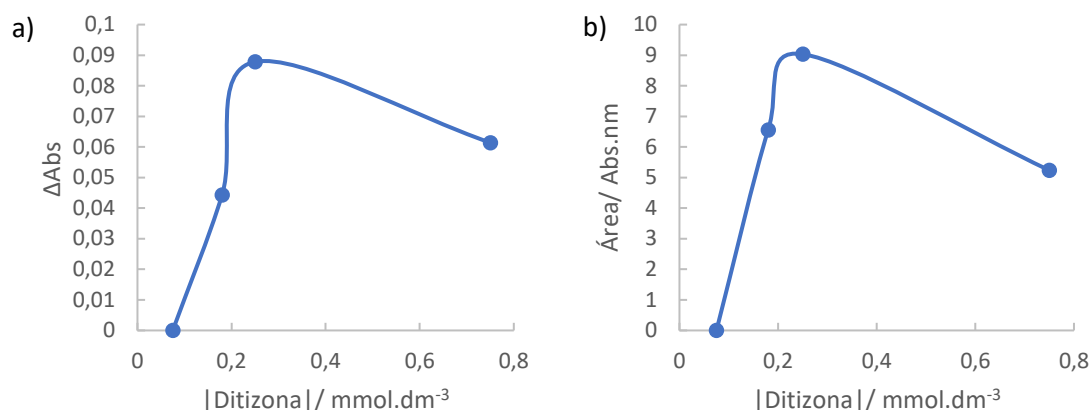


Figura 50 - Variação do módulo do decréscimo da absorvância a) e área b) da banda a 460 nm, em função da concentração de ditizona

Por análise dos gráficos obtidos para os diferentes métodos de análise dos espectros de UV-Vis, é possível verificar que, em geral, o aumento da concentração se traduz num melhor sinal. Contudo, em todos os 4 métodos o último ponto, ou seja, para 0,75 mmol.dm^{-3} , existe um decréscimo na qualidade do sinal, pelo que a concentração escolhida foi, então, os 0,25 mmol.dm^{-3} . A intensidade do sinal diminui, possivelmente, devido à membrana sensora apresentar uma banda a 460 nm com intensidade muito superior a 1 de absorvância (Figura 46), o que provoca erros no ajuste da linha de base. A diminuição da intensidade pode dever-se também à banda a 460 nm provocar intensidades elevadas, na ordem dos 0,45 na zona dos 550 nm, o que irá interferir com o aparecimento da banda a esse comprimento de onda.

Otimização do tempo de imersão em ditizona

De seguida optimizou-se o tempo de imersão na solução de ditizona, de acordo com o descrito no procedimento experimental. Testou-se 5 tempos diferentes para a imersão da membrana de CH-SiO_2 numa solução de ditizona 0,25 mmol.dm^{-3} , tendo sido obtidos os seguintes espectros de UV-Vis (Figura 51).

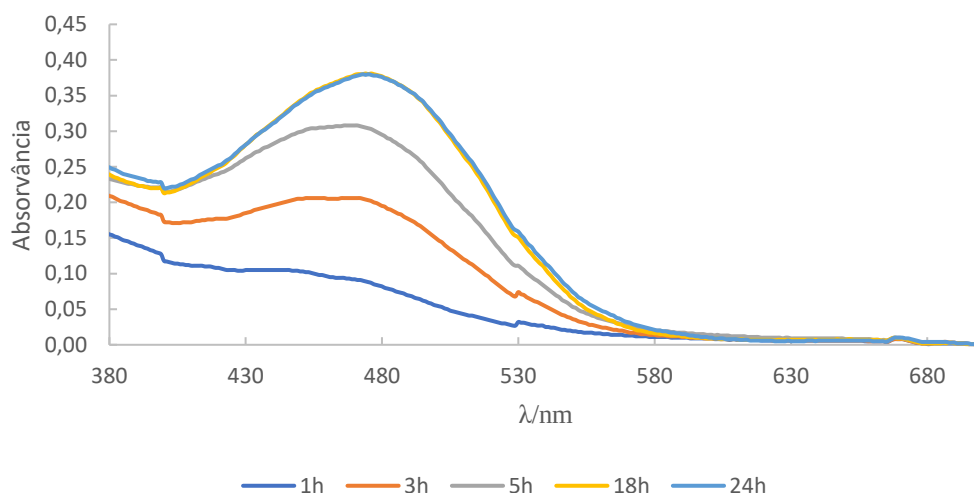


Figura 51 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para a membrana CH-SiO₂ imersa por diferentes tempos em 0,25 mmoldm⁻³ de ditizona

Novamente, para determinar a sensibilidade de cada membrana tendo em conta os diferentes tempos de imersão, foram imersas por 2 min numa solução de 10 ppm de Pb(II), de acordo com o procedimento. Os espectros obtidos estão representados na Figura 52.

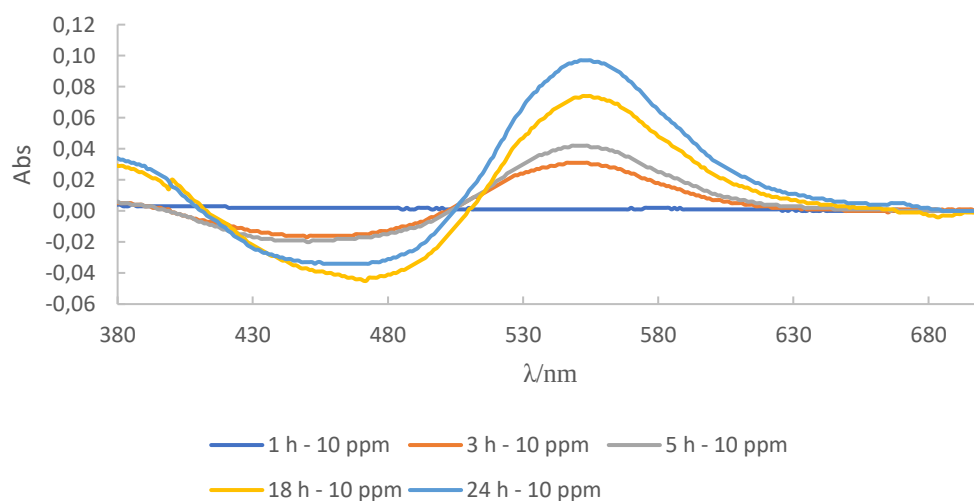


Figura 52 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membranas imersas diferentes tempos na mesma concentração de ditizona e posterior imersão em 10 ppm de Pb(II)

O estudo das bandas a 460 nm e 550 nm permitiu obter os seguintes gráficos (Figura 53 e 54), através dos quais será possível determinar o tempo ótimo de imersão.

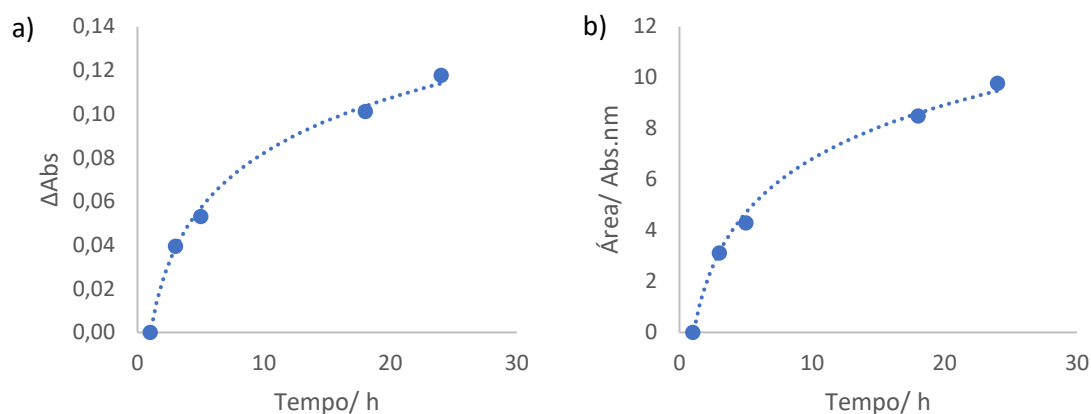


Figura 53 - Variação da absorvância máxima a) e área b) da banda a 550 nm, em função do tempo de imersão na solução de ditizona

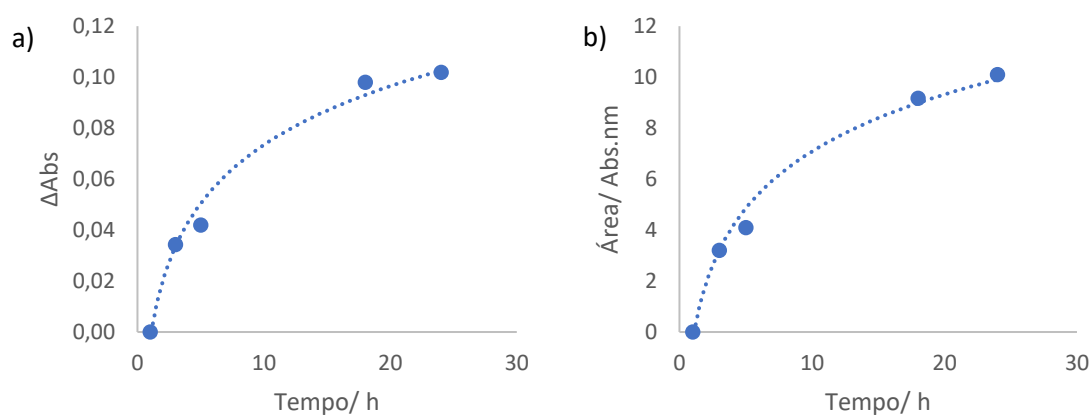


Figura 54 - Variação do módulo do decréscimo da absorvância a) e área b) da banda a 460 nm, em função do tempo de imersão na solução de ditizona

Todos os gráficos de análise dos espectros de UV-Vis revelam a mesma tendência da intensidade do sinal em função do tempo de imersão. Para tempos elevados, nomeadamente entre 18 h e 24 h verifica-se uma tendência para estabilizar o sinal. Não se espera um aumento grande, também, após as 24 h, uma vez que a solução de ditizona, que apresenta um tom verde escuro, ao fim de 24 h quase não apresenta cor, devido à passagem da ditizona da solução para a membrana. Deste modo, o tempo escolhido como imersão de ditizona foi de 24 h.

Otimização do tempo de imersão na solução de catião chumbo

Com o intuito de verificar qual o tempo de contacto ótimo da membrana com a solução contendo $Pb(II)$, fez-se mergulhar a membrana, onde previamente foi incorporado o cromóforo de acordo com a melhor concentração e tempo de imersão determinados anteriormente, por diferentes períodos, não superiores a 15 min devido à finalidade de aplicação a um sensor ótico, que será para determinação de chumbo no local e em tempo real, pelo que não será vantajoso um sensor que demore a fornecer o resultado da análise. Os resultados estão presentes na Figura 55.

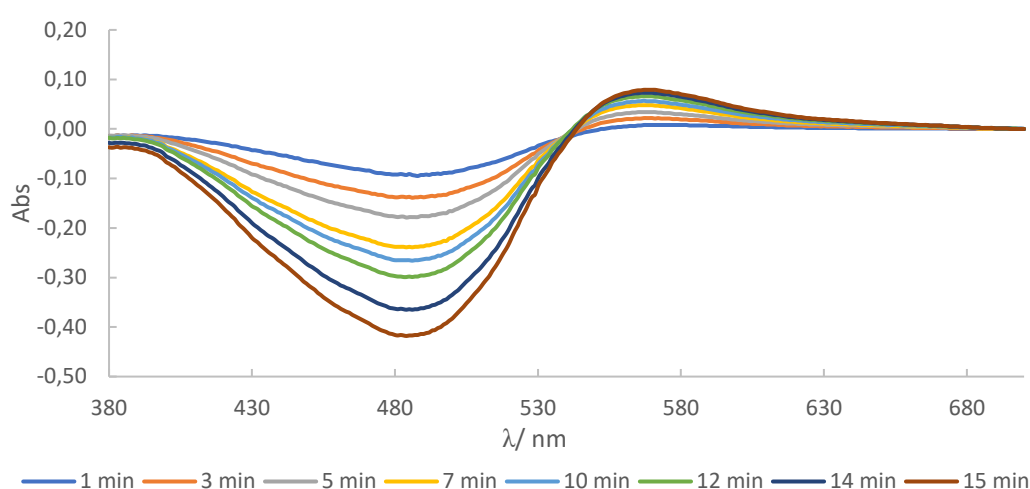


Figura 55 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membranas imersas por diferentes tempos na solução 10 ppm de $Pb(II)$

Pela análise visual da Figura 55, nota-se uma maior sensibilidade da banda a 460 nm comparativamente com a banda a 550 nm, pois sofre alterações mais acentuadas com o tempo de imersão em chumbo, enquanto a 550 nm o aumento da intensidade dá-se de uma forma mais suave.

A partir da análise dos espectros obtidos foi possível obter os seguintes gráficos (Figura 56 a 57).

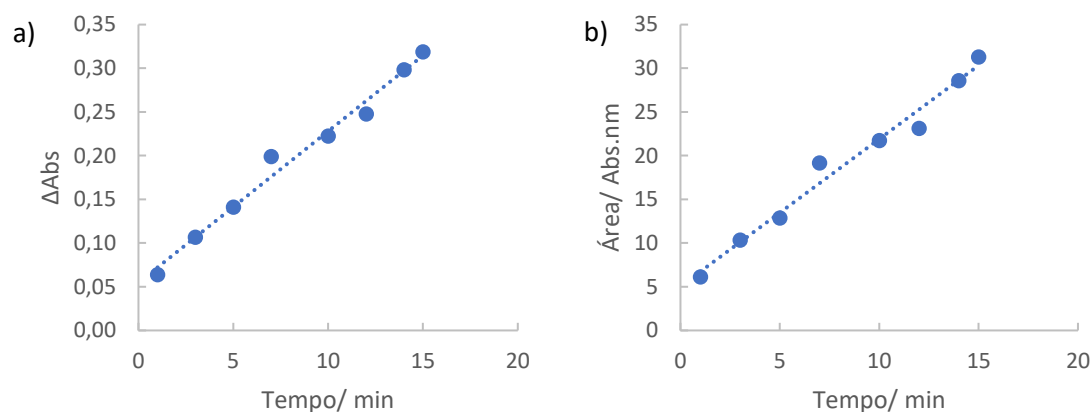


Figura 56 - Variação da absorvância máxima a) e área b) da banda a 550 nm, em função do tempo de imersão na solução de Pb(II)

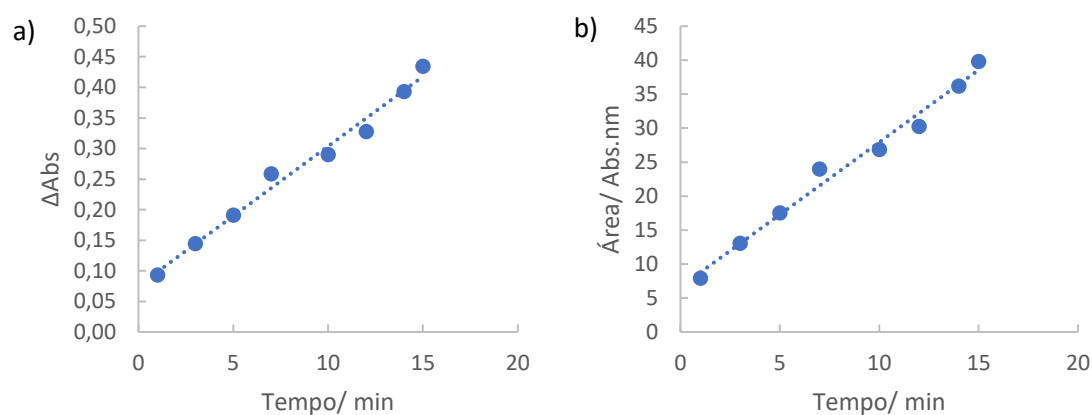


Figura 57 - Variação do módulo do decréscimo da absorvância a) e área b) da banda a 460 nm, em função do tempo de imersão na solução de Pb(II)

Através dos resultados apresentados é possível ver que existiu um aumento aproximadamente regular entre o sinal obtido e o tempo de imersão na solução de Pb(II). Pelo que foi possível concluir que o aumento do tempo de imersão permite uma maior quantidade de cátions chumbo se ligue à ditizona formando o complexo. O tempo de imersão escolhido por compromisso entre a relação de um bom sinal e tempo de espera curto foi de 10 min.

No entanto, devido à influência tão acentuada do tempo de imersão na solução de chumbo com a intensidade do sinal, é necessário que o tempo seja muito bem controlado.

4.4. Avaliação do desempenho das membranas sensoras

De modo a obter uma curva de calibração para os membranas sensoras obtidas, fez-se imergir o sensor já otimizado em soluções padrão com diferentes concentrações de Pb(II), preparadas de acordo com o procedimento em 2.4..

A primeira calibração foi realizada para o sensor com base na membrana CH-SiO₂, cujos espectros obtidos estão apresentados na Figura 58.

De seguida foram realizadas as calibrações para os sensores contendo as membranas de CH-CS e CH-Fd, em que as proporções entre biopolímeros correspondiam a 1:210 e 1:490 (CS/Fd:CH). Os espectros obtidos estão apresentados nas Figuras 59 e 60.

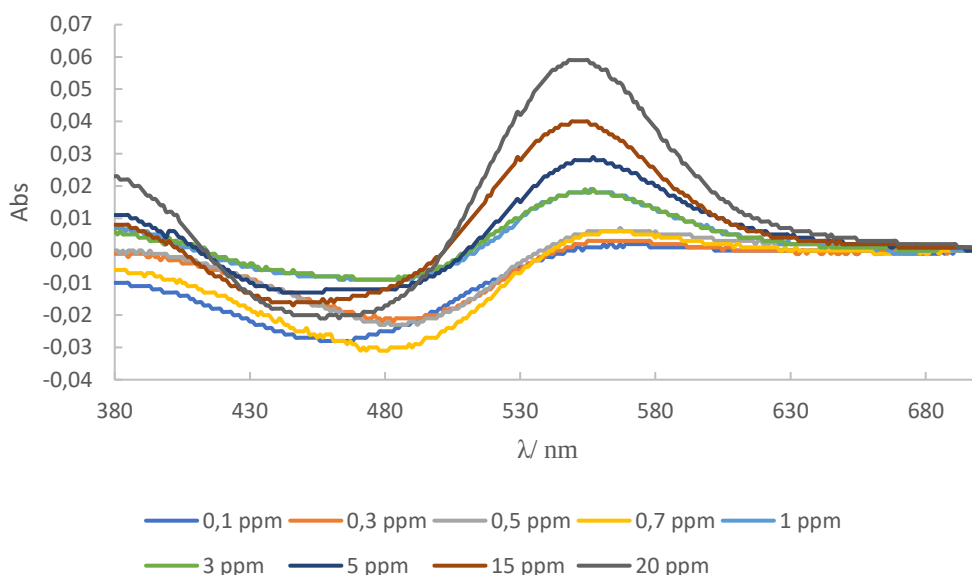


Figura 58 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membrana CH-SiO₂ imersa em soluções com diferentes concentrações de Pb(II)

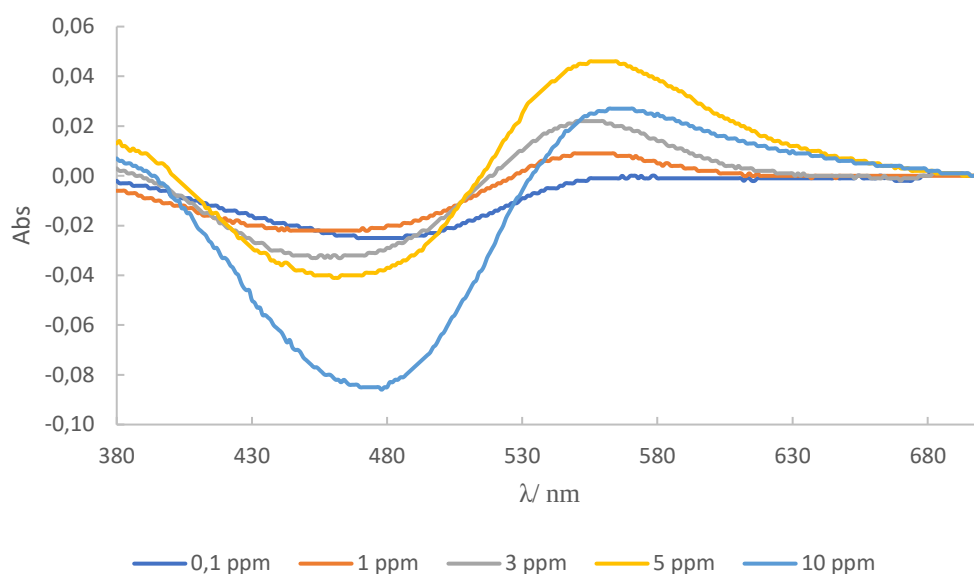


Figura 59 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membrana CH-CS (1:210) imersa em soluções com diferentes concentrações de Pb(II)

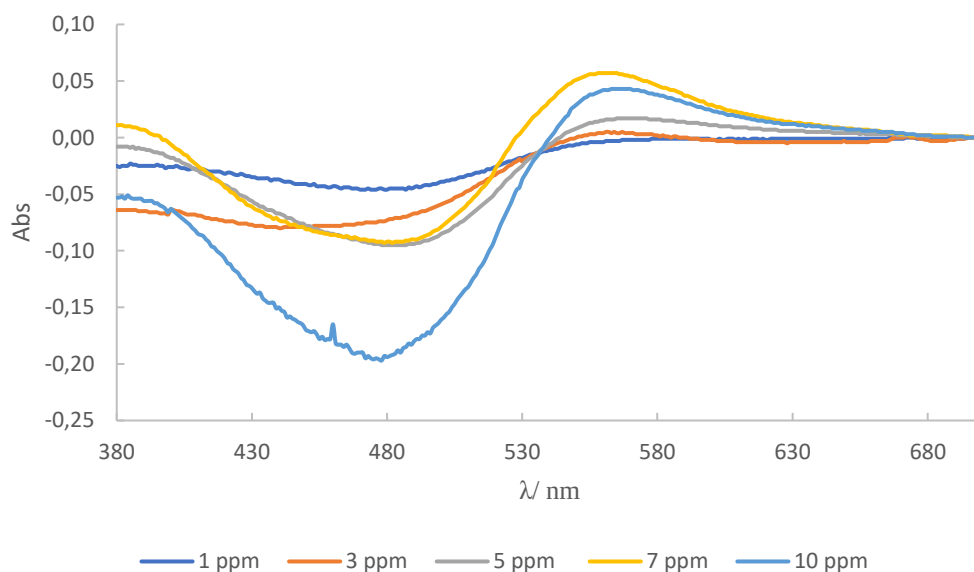


Figura 60 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membrana CH-Fd (1:490) imersa em soluções com diferentes concentrações de Pb(II)

Através dos espectros obtidos foi possível recorrer à sua análise, tendo sido realizados o mesmo tratamento que dos dados anteriores (Figura 61 e 62). Ao longo do trabalho verificou-se que a análise das absorvâncias e das áreas das bandas apresentavam a mesma tendência, pelo que foi considerado dispensável continuar com a análise das

áreas, uma vez que tendo em conta a aplicação final em sensor, a complexidade dos cálculos computacionais da análise do máximo das absorvância é menor.

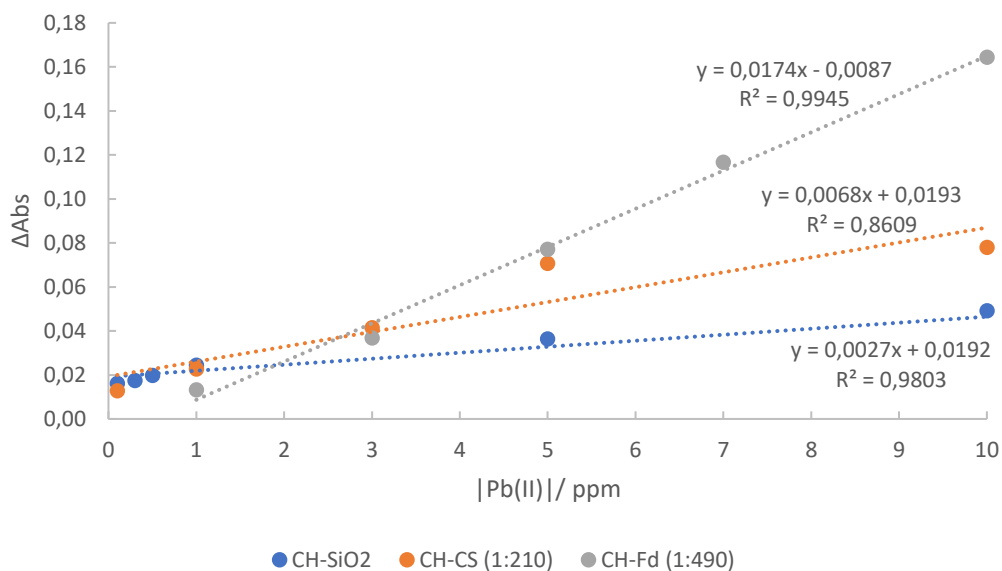


Figura 61 - Curvas de calibração da variação absorvância máxima da banda a 550 nm, em função da concentração de Pb(II) para CH-SiO₂, CH-CS (1:210) e CH-Fd (1:490)

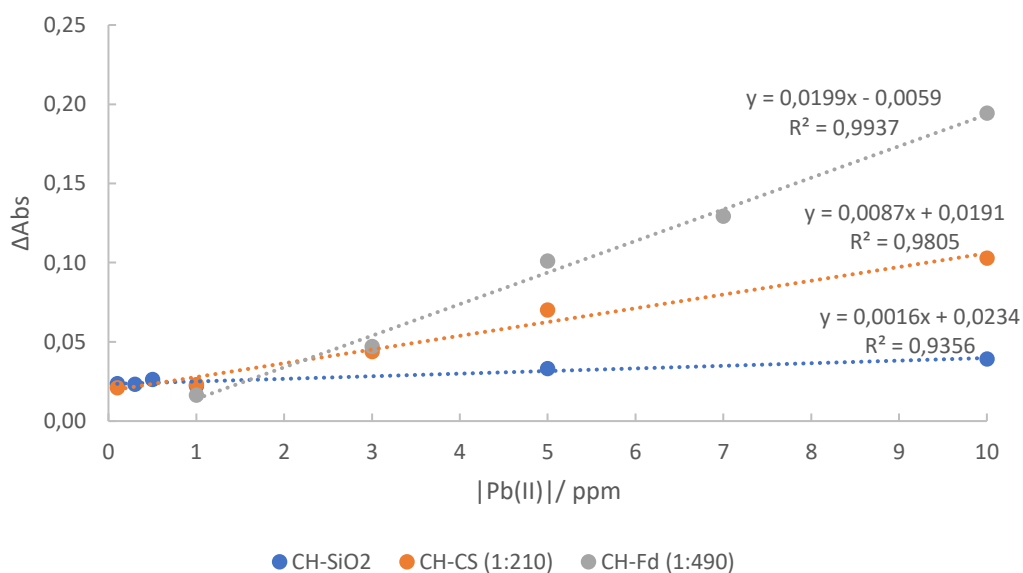


Figura 62 - Curvas de calibração da variação da absorvância da banda a 460 nm, em função da concentração de Pb(II) para CH-SiO₂, CH-CS (1:210) e CH-Fd (1:490)

Priorizou-se a escolha de um ajuste linear, pois para a aplicação a um sensor, um ajuste desta natureza necessita de cálculos menos complexos.

Pela análise dos gráficos (Figura 61 e 62), é possível obter um ajuste para as 3 membranas sensoras, tendo sido notável que as membranas contendo os polissacarídeos sulfatados apresentaram um melhor sinal do que a membrana contendo apenas o quitosano. Tal pode dever-se à presença dos grupos sulfato e / ou carboxilato, que interagem com os catião chumbo da solução, atraindo uma maior quantidade destes catiões, o que permite a maior formação de complexos ditizona-chumbo.

Determinou-se o limite de deteção através do cálculo presente através da seguinte expressão:

$$L. D. = \frac{s * 3,3}{m}$$

onde s representa o desvio padrão determinado a partir da análise de diversos “brancos” e m o declive das respetivas curvas de calibração.

Para a membrana CH-SiO₂ obteve-se um limite de deteção de 13 e 42 ppm, para análise da variação das absorvâncias das bandas a 550 e 460 nm, respetivamente. Os limites foram muito elevados, algo possível devido a nesta membrana se ter obtido uma curva de calibração com absorvâncias muito baixas, estando mais sujeita às variações devidas ao “branco”. O desvio padrão do “branco” foi realizado através da realização da linha de base numa porção da membrana e posterior análise de diferentes porções da membrana, o que provoca um elevado desvio devido à heterogeneidade da membrana, algo visível na espessura e na incorporação da ditizona. Este valor de desvio padrão elevado afeta muito os limites de deteção tendo em conta a baixa gama de absorvâncias da calibração desta membrana, onde os valores de $s * 3,3$ quer para a banda a 550, quer para 460 nm apresentam valores de 0,036 e 0,067, respetivamente. No caso da membrana CH-CS (1:210) foi possível determinar um limite de deteção de 5,3 e 7,7 ppm para a banda a 550 e 460 nm, respetivamente. A membrana de CH-Fd (1:490), foi a que apresentou menores limites de deteção com 2 ppm para a banda a 550 nm e 3,4 ppm para a banda a 460 nm.

De seguida foram realizadas as calibrações para as membranas sensoras contendo uma maior quantidade de sulfato de condroitina e fucoidano, de modo a verificar o efeito que estes biopolímeros possuem na qualidade do sensor. Os espectros obtidos estão apresentados nas Figuras 63 e 64.

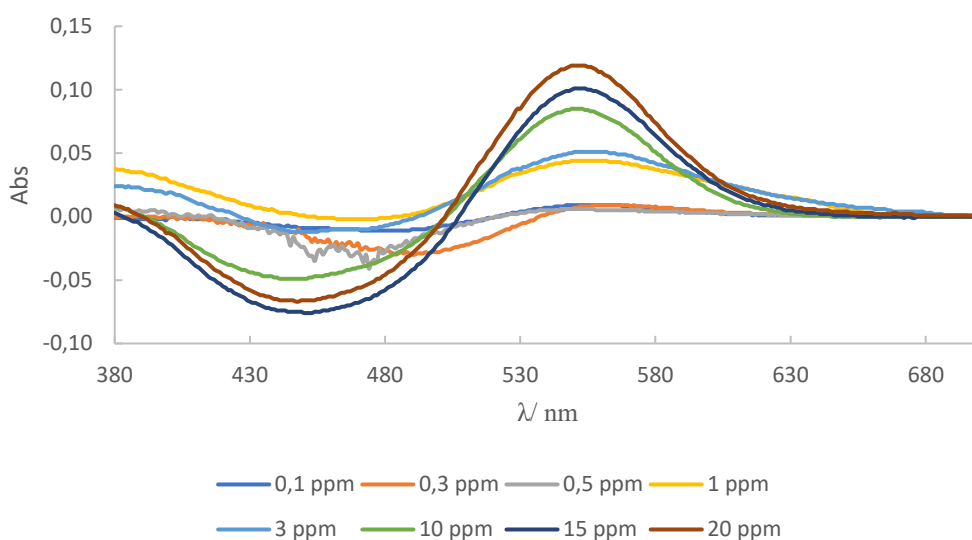


Figura 63 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membrana CH-CS imersa em soluções com diferentes concentrações de Pb(II)

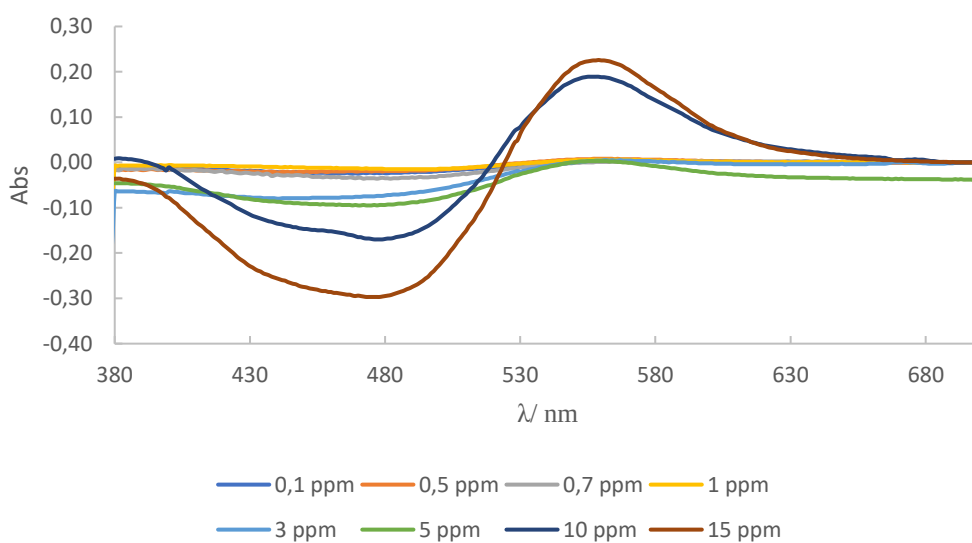


Figura 64 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membrana CH-Fd imersa em soluções com diferentes concentrações de Pb(II)

Realizando a mesma análise que para as membranas sensoras anteriores e comparando com a mesma membrana sensora de CH-SiO₂, obteve-se os seguintes gráficos (Figura 65 e 66).

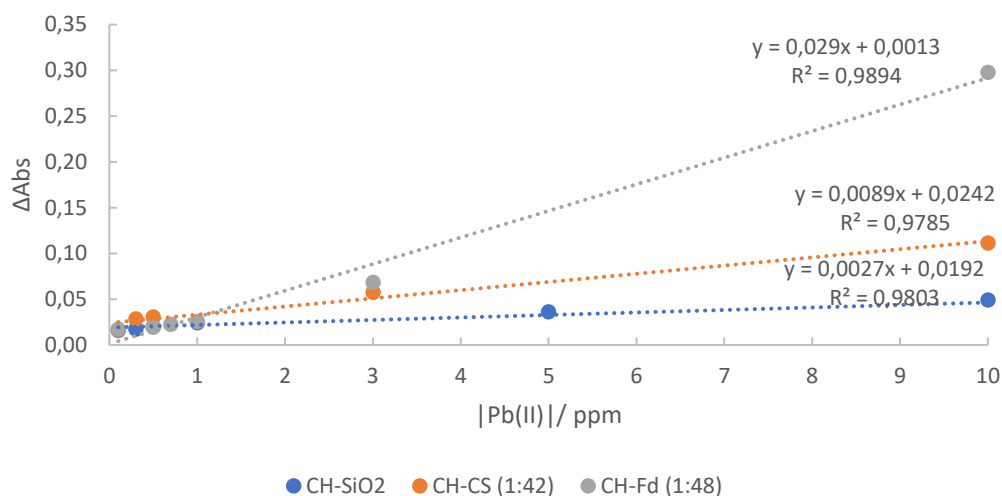


Figura 65 - Curvas de calibração da variação da absorvância máxima da banda a 550 nm, em função da concentração de $Pb(II)$ para CH- SiO₂, CH-CS (1:42) e CH-Fd (1:48)

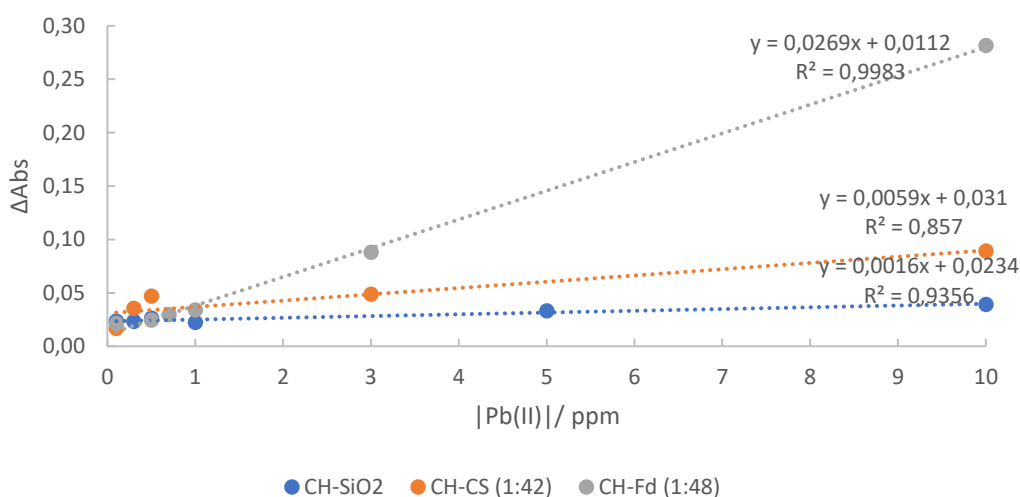


Figura 66 - Curvas de calibração da variação da absorvância da banda a 460 nm, em função da concentração de $Pb(II)$ para CH- SiO₂, CH-CS (1:42) e CH-Fd (1:48)

Através das Figuras 65 e 66, é possível verificar que a tendência anteriormente manifestada (Figura 61 e 62) se manteve, ou seja, as membranas com dois biopolímeros apresentam melhor sinal do que a membrana com apenas um biopolímero, um aumento de sinal de 230 % para CH-CS (1:42) e 900 % para CH-Fd (1:48), pela análise da variação das absorvâncias na banda a 550 nm, o mesmo ocorre para a banda a 460 nm.

Tendo em conta a banda correspondente à complexação da ditizona, a 550 nm, comparando a Figura 65 com a Figura 61, é possível verificar um aumento no sinal entre as membranas contendo os mesmos biopolímeros. No caso da membrana de CH-Fd houve um aumento da sensibilidade, tendo em consideração o declive, de 67 %. Para CH-CS o aumento que se verificou foi na ordem dos 30 %. Estes resultados mostram a importância da matriz da base do sensor, uma vez que é um dos parâmetros responsáveis pela permeação do analito e a sua atração para junto do cromóforo que permitirá a sua deteção. No entanto, para a banda a 460 nm, verifica-se um aumento de sinal na ordem dos 35 % para CH-Fd, mas uma redução de cerca de 40 % para CH-CS.

Foram determinados os limites de deteção, tendo-se obtido para a membrana de CH-CS (1:42) limites de 4 e 11 ppm, e no caso da membrana de CH-Fd (1:48), 1,2 e 2,5 ppm, para a análise da variação da absorvância das bandas a 550 e 460 nm, respetivamente. Pela análise dos limites de deteção das diferentes membranas estudadas, nota-se uma tendência em todas de limites de deteção superiores correspondentes à análise da banda de 460 nm, pelo que se conclui que a banda a 550 nm permite obter curvas de calibração com melhores limites de deteção. Para estudos futuros, será considerada apenas a banda a 550 nm.

Avaliação da impressão molecular

O mesmo estudo foi realizado para as membranas impressas com Pb(II), no entanto não foi possível obter uma curva de calibração, uma vez que as variações obtidas são mínimas e para as membranas NIM e MIM, com o mesmo tratamento e imersas na mesma concentração de Pb(II) o sinal é muito inferior para o MIM, como se pode ver no exemplo das Figuras 67 e 68.

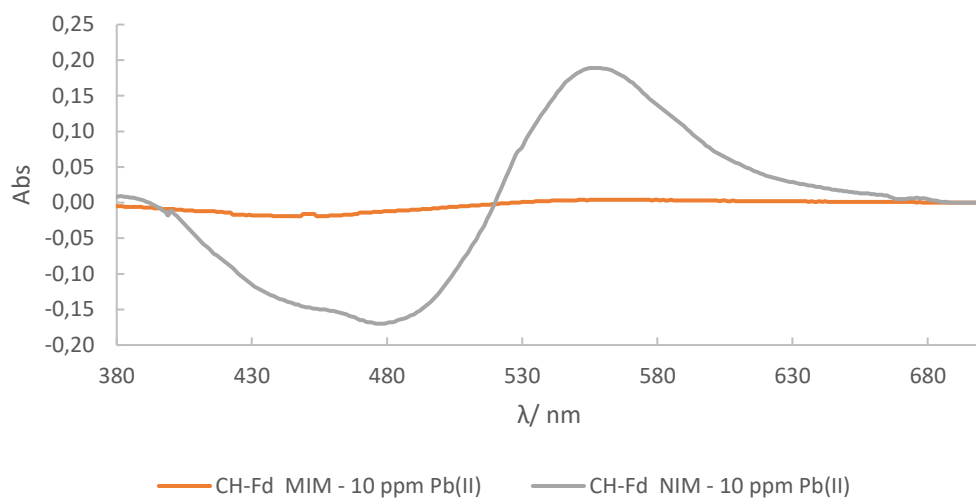


Figura 67 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis para o sensor CH-Fd NIM e MIM imersos em 10 ppm de Pb(II)

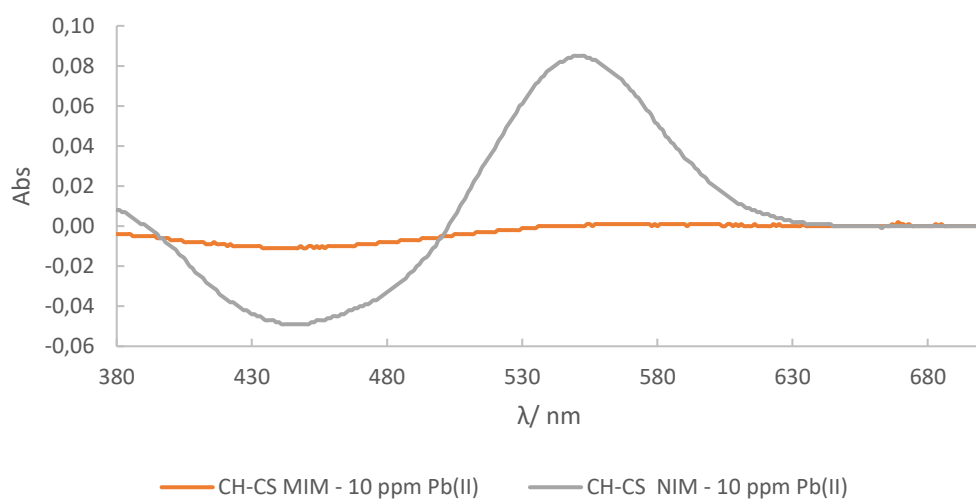


Figura 68 - Representação gráfica dos espetros de UV-Vis para o sensor CH-CS NIM e MIM imersos em 10 ppm de Pb(II)

Tal pode dever-se ao facto do MIM não estar a incorporar a mesma quantidade de ditizona, algo perceptível por UV-Vis (Figura 69) e também visualmente (Figura 70).

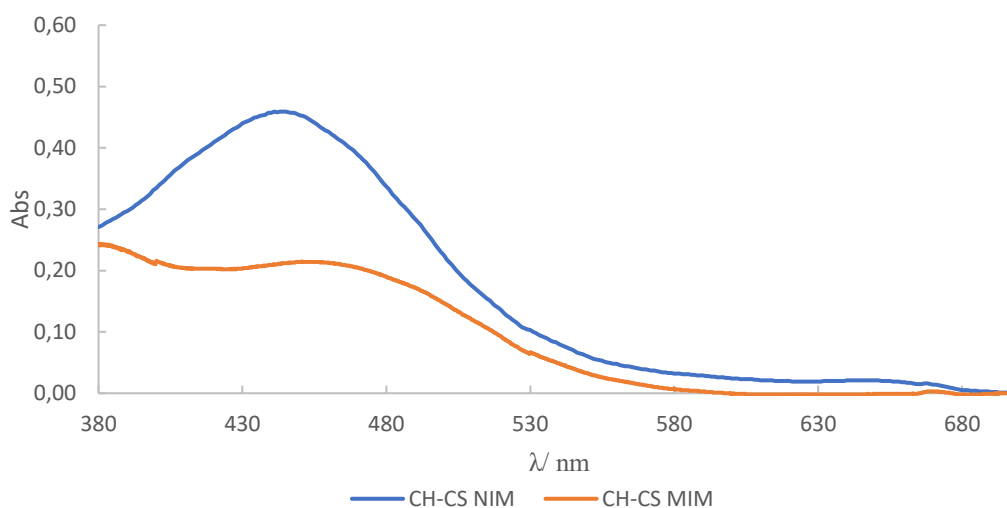


Figura 69 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis do sensor de CH-CS NIM e MIM para as mesmas condições de incorporação de ditizona

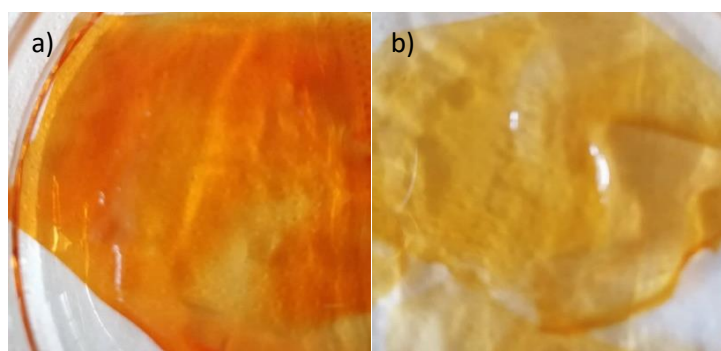


Figura 70 - Aspeto visual da membrana CH-CS NIM a) e MIM b)

A incorporação da ditizona na membrana, especula-se que se realize por intermédio do glutaraldeído, o que sugere que a impressão pode estar a alterar a estrutura da membrana de modo a comprometer os grupos de glutaraldeído disponíveis.

Deste modo, é possível concluir que é necessário recorrer ao processo de otimização da incorporação da ditizona nos MIM, de modo a que seja possível obter uma incorporação o mais semelhante ao NIM análogo.

Estudo de espécies interferentes

De forma preliminar, foi estudada a interação da membrana com uma espécie interferente, neste caso, devido à semelhança entre tamanhos atômicos e interações com estruturas biológicas, foi escolhido como espécie interferente o catião cádmio. Devido a conhecimento prévio, espera-se que a membrana possua uma melhor seletividade pelo catião chumbo, deste modo realizou-se inicialmente uma calibração da membrana CH-SiO₂ com padrões de cádmio (Figura 71).

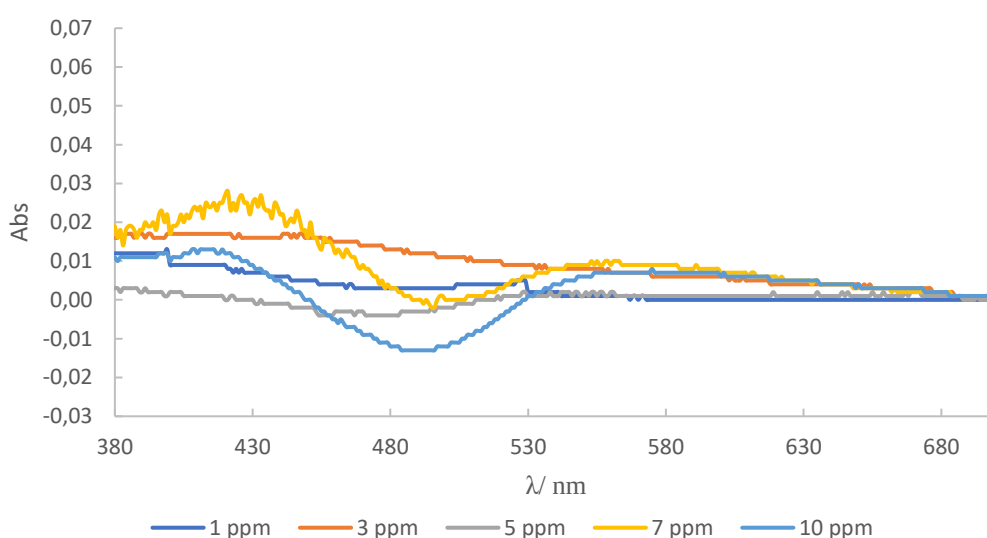


Figura 71 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis para as membrana CH-SiO₂ imersa em soluções com diferentes concentrações de Cd(II)

Pela análise dos espectros de UV-Vis da membrana após contacto com catião cádmio, verifica-se que surge uma banda a cerca de 420 nm. No entanto, as absorvâncias obtidas foram muito baixas, pelo que nesta gama de concentrações de Cd(II) não foi possível determinar uma curva de calibração.

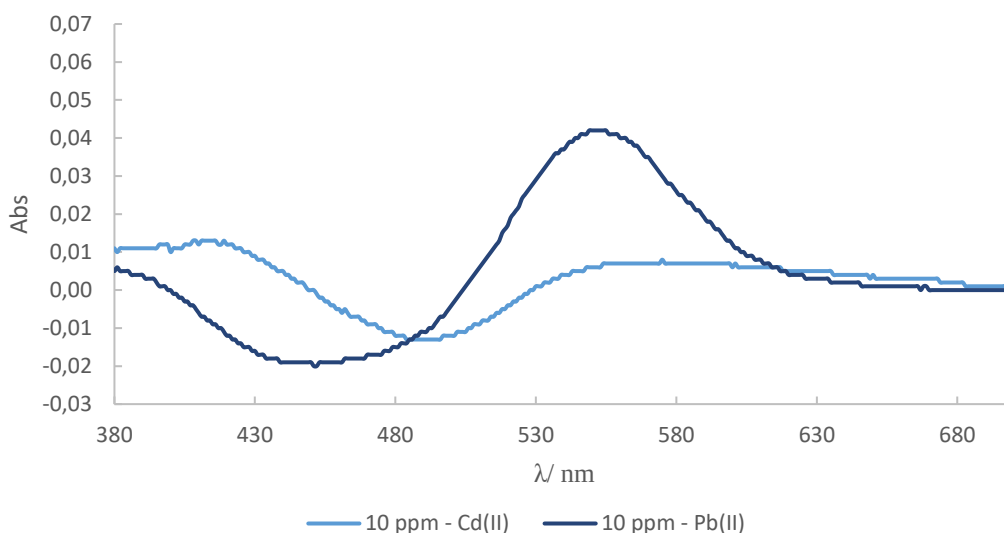


Figura 72 - Comparação dos espectros de UV-Vis para a membrana CH-SiO₂ imersa em 10 ppm de Cd(II) e 10 ppm de Pb(II)

Comparando a absorvância da imersão da mesma membrana em 10 ppm de Pb(II) com 10 ppm de Cd(II) é notório uma grande diferença (Figura 72), cerca de 3 vezes superior para Pb(II). No entanto, ainda são testes preliminares, que necessitam de ser repetidos e expandidos para as restantes membranas, nas quais se espera melhor seletividade do que pela membrana de CH-SiO₂.

De modo a verificar se a presença de cádmio influenciaria a determinação de chumbo, fez-se a análise de diferentes concentrações deste catião, na presença de 5 ppm de Cd(II) (Figura 73).

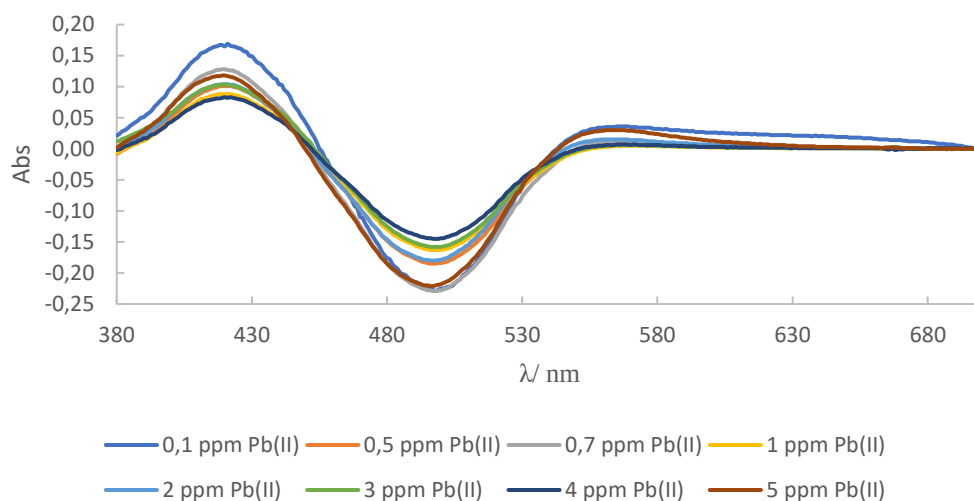


Figura 73 - Representação gráfica dos espectros de UV-Vis da membrana CH-SiO₂ imersa numa solução com diferentes concentrações de Pb(II) e 5 ppm de Cd(II)

Surge uma banda a 420 nm, possivelmente devido à complexação de Cd(II) que pode ser analisada a sua intensidade de acordo com o aumento da concentração Pb(II) (Figura 74).

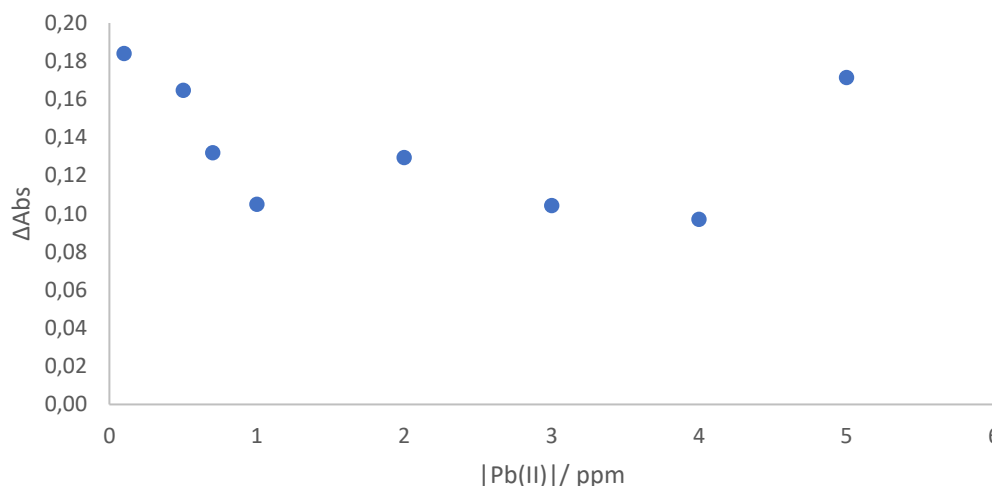


Figura 74 - Variação da absorvância máxima da banda a 550 nm, em função da concentração de Pb(II) para CH- SiO₂

Através da análise do máximo de absorvância da banda devida à complexação da ditizona com chumbo a 550 nm verifica-se que existe uma grande competição pela complexação da ditizona com o cádmio, impedindo a complexação com o catião chumbo. Para 0,1 ppm de Pb(II) e 5 ppm de Cd(II), existe uma maior complexação de

Cd(II), no entanto, à medida que a concentração de catião chumbo sobe mantendo a concentração de catião cádmio, a intensidade deste diminui inicialmente e começa a estabilizar. Verifica-se, no entanto, uma tendência inicial semelhante para a banda correspondente à complexação com o catião cádmio a 420 nm (Figura 75). Possivelmente, o que ocorre é que à medida que a concentração de catião chumbo aumenta, diminui a complexação com o catião cádmio.

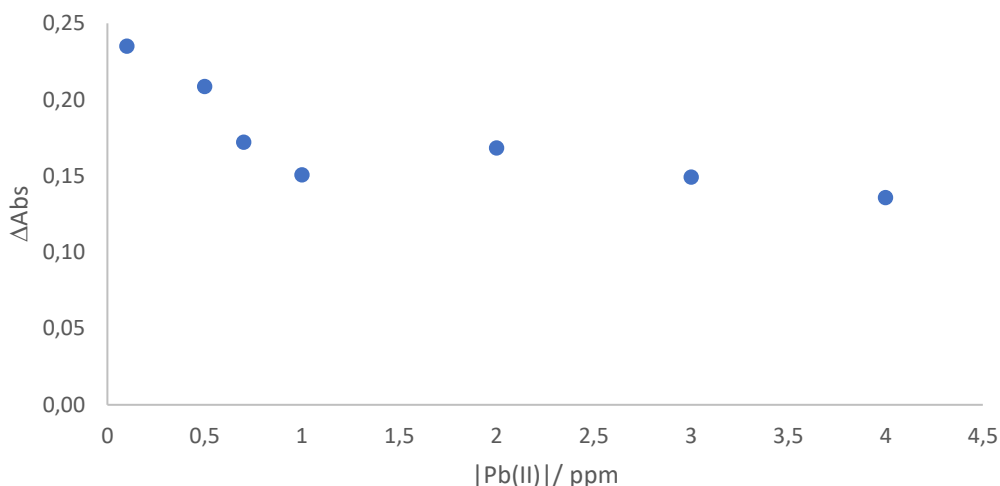


Figura 75 - Variação da absorvância máxima da banda a 420 nm, em função da concentração de Pb(II) para CH- SiO₂

Comparando as membranas sensoras obtidas com os optosensores de chumbo já presentes na literatura existem diferenças no que se relaciona com a gama de concentrações de catião chumbo estudada e principalmente, no que se relaciona com os limites de deteção. No entanto é necessário ter em consideração diferenças existentes entre metodologias envolvidas.

Dos diferentes optosensores apresentados os que usam o alaranjado de xilenol numa resina de permuta aniónica e a ditizona numa resina de Amberlite XAD-4, que obtiveram limites de deteção de 0,62 e 0,002 ppm, diferem muito dos apresentados nesta tese. [65, 66]. Estes dois casos diferem no método utilizado, uma vez que recorrem à análise da refletância em vez da absorvância, para além de não serem incorporados os cromóforos numa membrana, mas sim em resinas de partículas 70 a 200 µm, o que altera a área superficial de contacto do material com os catiões chumbo em solução. Outra importante diferença é a utilização de resinas que são aplicadas para a pré-concentração de catiões chumbo.

Os outros três casos apresentados assemelham-se pela utilização de membranas como base para fixação do cromóforo e na utilização da análise da absorvância [32, 67, 68]. No caso do optosensor de cálix(4)areno imobilizado numa membrana de PVC, os autores não apresentam limites de deteção, o que não permite uma boa comparação. [67]. No caso de ACDA imobilizado na membrana de celulose os autores apresentam um limite de deteção de 0,14 ppm [68], pelo que comparando com os valores obtidos (1,2 ppm para CH-Fd (1:48), 4 ppm para CH-CS (1:42)) é um valor bastante inferior. No entanto, como já referido anteriormente, o desvio padrão do “branco” foi elevado no presente trabalho, pelo que conseguindo melhorar a homogeneidade da membrana ou utilizar a mesma porção de membrana para cada estudo deverá ser possível reduzir o valor do limite de deteção. O mesmo ocorre para o caso do optosensor de ditizona imobilizada numa membrana de quitosano e sílica, cujo valor de limite de deteção apresentado foi 0,11 ppm [32]. Este caso é o mais semelhante ao estudado, no entanto, as diferenças de limites de deteção, para além das possíveis razões já apresentadas, poderá também dever-se à presença de mais componentes nas membranas propostas, nomeadamente o glutaraldeído e o glicerol, que podem prejudicar a interação da membrana com o catião chumbo.

Os trabalhos anteriores citados revelaram que catiões como cádmio, cobalto níquel e cobre, são potenciais importantes interferentes na deteção do Pb(II), tal como observado no presente trabalho para o caso do Cd(II) [32, 65, 68]. Assim nota-se, em geral, a ausência de seletividade destes optosensores, algo que se espera vir a melhorar com as membranas de CH-Fd e CH-CS, que ainda não foram testadas na presença de interferentes, bem como com a impressão molecular.

Conclusão

Nesta tese, foram apresentados três tipos de membranas sensora para Pb(II), testadas em solução tampão de acetato de sódio / ácido acético a pH 5,5. Estas membranas visavam a deteção de catião chumbo através da complexação deste catião com um cromóforo, nomeadamente, a ditizona. A formulação das sínteses foi dos passos mais demorados, tendo sido precisos ajustar diversos parâmetros para obter uma membrana com as características finais pretendidas. O glicerol e o glutaraldeído foram importantes nesta tarefa, uma vez que melhoram a maleabilidade e estabilidade da membrana em solução aquosa, respetivamente, parâmetros essenciais para obter uma boa membrana sensora.

A utilização de diferentes biopolímeros na formulação das membranas foi outro ponto estudado e procurou-se otimizar de modo a incorporar o máximo de biopolímeros sulfatados na membrana. Através das diferentes formulações das matrizes das membranas foi possível concluir, que embora a escolha do cromóforo seja um ponto fundamental, também o é a escolha da matriz da membrana. Diferentes matrizes permitiram obter diferentes sinais, uma vez que a matriz é a base do sensor, sendo responsável pela permeação do analito e a sua atração para junto do cromóforo que permitirá a sua deteção. Membranas com biopolímeros sulfatados apresentam melhor deteção do que a membrana com apenas quitosano, possivelmente devido aos grupos sulfato e ao grupo carboxilato, possuir uma boa interação com o catião chumbo, o que permitiu melhorias no sinal na ordem dos 900 e 230 % para a membrana com fucoidano - CH-Fd (1:48) e sulfato de condroitina – CH-CS (1:42), respetivamente, quando comparado com a membrana sem este biopolímeros. Os limites de deteção destas membranas, foram inferiores ao da membrana baseada em apenas quitosano, CH-SiO₂, cujo valor foi de 13 ppm, comparativamente, para a membrana CH-CS (1:42) o valor foi de 4 ppm e de 1,2 ppm para membrana de CH-Fd (1:48).

O estudo com espécies interferentes, nomeadamente entre Pb(II) e Cd(II), revela que para baixas concentrações de catião chumbo não é possível a deteção correta, uma vez que o sinal é influenciado pela presença de cádmio. Este parâmetro espera-se que venha a ser ultrapassado através da impressão molecular. No entanto, apenas foi ainda realizado este estudo para a membrana de CH-SiO₂, pelo que se espera obter uma melhor seletividade pelo catião chumbo nas membranas com os polissacarídeos

sulfatados, uma vez que estes já se revelaram com melhores capacidades de interação com chumbo em comparação com outros cátions metálicos [22, 38, 77, 78].

No que se relaciona com a impressão molecular, espera-se que ao possuir uma matriz com impressão molecular, permita que a membrana que possua maior atração do analito de interesse para a membrana, aumentando, também, o tempo de contacto deste com o cromóforo, permitindo deste modo uma melhor sensibilidade, bem como tornar a membrana sensora mais seletiva. No entanto, tal não foi possível verificar, essencialmente devido à fraca incorporação de ditizona na membrana, algo ainda a ser estudado e melhorado, mas que possivelmente se deve a alterações estruturais provocadas pela impressão molecular, que comprometem grupos importantes para a ligação da ditizona à membrana.

Em comparação geral com os optosensores presentes na literatura para o cátion chumbo, são notórias diferenças nos limites de deteção obtidos, onde em geral foram obtidos limites inferiores a 0,5 ppm, sendo que o menor limite obtido nesta tese foi 1,2 ppm, para a membrana de CH-Fd e 4 ppm para a membrana de CH-CS. Uma vez que estes valores dependeram do desvio-padrão do “branco”, espera-se conseguir reduzir os limites de deteção com uma melhor homogeneidade das membranas, nomeadamente no que se relaciona com a espessura, algo dependente do método de deposição utilizado (*casting*). Por outros métodos possivelmente poderá obter-se membranas mais finas e com melhor distribuição de espessura. Algo também a melhorar é a homogeneidade da incorporação da ditizona. Melhorando estes dois parâmetros, será possível obter menores valores de desvio-padrão associados aos “brancos” a estas membranas. Por outro lado, algo que também poderá melhorar estes valores, será a utilização da mesma porção de membrana para o mesmo estudo, uma vez que sofre menos variações de linha de base, algo já realizado em alguns dos outros optosensores da literatura.

Referências bibliográficas

1. Oehme, I., & Wolfbeis, O. (1997). *Optical sensors for determination of heavy metal ions*. *Mikrochimica Acta*, 126(3-4), 177-192. doi: 10.1007/bf01242319.
2. Bosch, M., Sánchez, A., Rojas, F., & Ojeda, C. (2007). *Recent Development in Optical Fiber Biosensors*. *Sensors*, 7(6), 797-859. doi: 10.3390/s7060797.
3. Hulanicki, A., Glab, S., & Ingman, F. (1991). *Chemical sensors: definitions and classification*. *Pure and Applied Chemistry*, 63(9), 1247-1250. doi: 10.1351/pac199163091247.
4. Uygun, Z., Ertugrul Uygun, H., Ermis, N., & Canbay, E. (2015). *Molecularly Imprinted Sensors — New Sensing Technologies*. *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications*. doi: 10.5772/60781.
5. Turdean, G. (2011). *Design and Development of Biosensors for the Detection of Heavy Metal Toxicity*. *International Journal Of Electrochemistry*, 2011, 1-15. doi: 10.4061/2011/343125.
6. Stradiotto, N., Yamanaka, H., & Zanoni, M. (2003). *Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry*. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 14(2), 159-173. doi: 10.1590/s0103-50532003000200003.
7. Antuña-Jiménez, D., Díaz-Díaz, G., Blanco-López, M., Lobo-Castañón, M., Miranda-Ordieres, A., & Tuñón-Blanco, P. (2012). *Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors: Past, Present and Future*. *Molecularly Imprinted Sensors*, 1-34. doi: 10.1016/b978-0-444-56331-6.00001-3.
8. Kaur, B., Kaur, N., & Kumar, S. (2018). *Colorimetric metal ion sensors – A comprehensive review of the years 2011–2016*. *Coordination Chemistry Reviews*, 358, 13-69. doi: 10.1016/j.ccr.2017.12.002.
9. Annamdas, V. (2012). *Review on Developments in Fiber Optical Sensors and Applications*. *International Journal Of Materials Engineering*, 1(1), 1-16. doi: 10.5923/j.ijme.20110101.01.
10. Rinaudo, M. (2008). *Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials*. *Polymer International*, 57(3), 397-430. doi: 10.1002/pi.2378.
11. Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K., Kumar, M., Pareek, N., & Vivekanand, V. (2019). *Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials*. *Bioresources And Bioprocessing*, 6(1). doi: 10.1186/s40643-019-0243-y

12. Daniel Elieh-Ali-Komi and Michael R Hamblin. (2016); *Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials*. Int. J. of Adv. Res. 4 (3). 411-427
13. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. ISBN 978-92-5-130688-8
14. Murado, M., Montemayor, M., Cabo, M., Vázquez, J., & González, M. (2012). *Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball*. Food and Bioproducts Processing, 90(3), 491-498. doi: 10.1016/j.fbp.2011.11.002.
15. Vazquez, J., Montemayor, M., Fraguas, J., & Murado, M. (2010). *Hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera*. Microbial Cell Factories, 9(1), 46. doi: 10.1186/1475-2859-9-46.
16. Vázquez, J., González, M., & Murado, M. (2004). *Peptones from autohydrolysed fish viscera for nisin and pediocin production*. Journal of Biotechnology, 112(3), 299-311. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.04.011.
17. Vázquez, J., Rodríguez-Amado, I., Montemayor, M., Fraguas, J., González, M., & Murado, M. (2013). *Chondroitin Sulfate, Hyaluronic Acid and Chitin/Chitosan Production Using Marine Waste Sources: Characteristics, Applications and Eco-Friendly Processes: A Review*. Marine Drugs, 11(12), 747-774. doi: 10.3390/md11030747.
18. Peniche, C., Argüelles-Monal, W., & Goycoolea, F. (2008). *Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 517-542. doi: 10.1016/b978-0-08-045316-3.00025-9.
19. Pillai, C., Paul, W., & Sharma, C. (2009). *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation*. Progress in Polymer Science, 34(7), 641-678. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001.
20. Cui, L., Gao, S., Song, X., Huang, L., Dong, H., & Liu, J. et al. (2018). *Preparation and characterization of chitosan membranes*. RSC Advances, 8(50), 28433-28439. doi: 10.1039/c8ra05526b.
21. Malavaki, C., Mizumoto, S., Karamanos, N., & Sugahara, K. (2008). *Recent Advances in the Structural Study of Functional Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate in Health and Disease*. Connective Tissue Research, 49(3-4), 133-139. doi: 10.1080/03008200802148546.
22. Ferreira, V., Azenha, M., Bustamante, A., Mêna, M., Moura, C., Pereira, C., & Silva, A. (2016). *Metal cation sorption ability of immobilized and reticulated chondroitin sulfate or fucoidan through a sol-gel crosslinking scheme*. Materials Today Communications, 8, 172-182. doi: 10.1016/j.mtcomm.2016.08.003.

23. Kylin, H. (1913). *Zur Biochemie der Meeresalgen*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie, 83(3), 171-197. doi: 10.1515/bchm2.1913.83.3.171.
24. Li, B., Lu, F., Wei, X., & Zhao, R. (2008). *Fuoidan: Structure and Bioactivity*. Molecules, 13(8), 1671-1695. doi: 10.3390/molecules13081671.
25. Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., & Muffler, K. (2012). *Novel procedures for the extraction of fuoidan from brown algae*. Process Biochemistry, 47(12), 1691-1698. doi: 10.1016/j.procbio.2012.06.016.
26. Öztóp, H., Saraydın, D., & Çetinus, S. (2002). *pH-Sensitive Chitosan Films for Baker's Yeast Immobilization*. Applied Biochemistry And Biotechnology, 101(3), 239-250. doi: 10.1385/abab:101:3:239.
27. Beppu, M., Vieira, R., Aimoli, C., & Santana, C. (2007). *Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption*. Journal Of Membrane Science, 301(1-2), 126-130. doi: 10.1016/j.memsci.2007.06.015.
28. Escárcega-Galaz, A., Sánchez-Machado, D., López-Cervantes, J., Sanches-Silva, A., Madera-Santana, T., & Paseiro-Losada, P. (2018). *Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings*. International Journal Of Biological Macromolecules, 116, 472-481. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.149.
29. Epure, V., Griffon, M., Pollet, E., & Avérous, L. (2011). *Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading*. Carbohydrate Polymers, 83(2), 947-952. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.09.003.
30. Nunes, C., Maricato, É., Cunha, Â., Rocha, M., Santos, S., & Ferreira, P. et al. (2016). *Chitosan–genipin film, a sustainable methodology for wine preservation*. Green Chemistry, 18(19), 5331-5341. doi: 10.1039/c6gc01621a.
31. Barczak, M., McDonagh, C., & Wencel, D. (2016). *Micro- and nanostructured sol-gel-based materials for optical chemical sensing (2005–2015)*. Microchimica Acta, 183(7), 2085–2109. doi:10.1007/s00604-016-1863-y.
32. Nur, Y., Rohaeti, E., & Darusman, L. (2017). *Optical Sensor for the Determination of Lead(II) Based On Immobilization of Dithizone onto Chitosan-Silica Membrane*. Indonesian Journal Of Chemistry, 17(1), 7-14. doi: 10.22146/ijc.23560.
33. Yari, A., & Abdoli, H. (2010). *Sol–gel derived highly selective optical sensor for sensitive determination of the mercury(II) ion in solution*. Journal of Hazardous Materials, 178(1-3), 713-717. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.01.146.
34. Phulé, P., & Wood, T. (2001). *Ceramics and Glasses, Sol–Gel Synthesis of*. Encyclopedia of Materials: Science And Technology, 1090-1095. doi: 10.1016/b0-08-043152-6/00201-1.

35. Hench, L. L., & West, J. K. (1990). *The sol-gel process*. Chemical Reviews, 90(1), 33–72. doi:10.1021/cr00099a003.
36. Danks, A. E., Hall, S. R., & Schnepf, Z. (2016). *The evolution of “sol-gel” chemistry as a technique for materials synthesis*. Materials Horizons, 3(2), 91–112. doi:10.1039/c5mh00260e.
37. Vasapollo, G., Sole, R., Mergola, L., Lazzoi, M., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G. (2011). *Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective*. International Journal of Molecular Sciences, 12(9), 5908-5945. doi: 10.3390/ijms12095908.
38. Pohanka, M. (2017). *Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers*. International Journal of Electrochemical Science, 8082-8094. doi: 10.20964/2017.09.67.
39. Ferreira, V. R. A., Azenha, M. A., Mêna, M. T., Moura, C., Pereira, C. M., Pérez-Martín, R. I., Silva, A. F. (2017). *Cationic imprinting of Pb(II) within composite networks based on bovine or fish chondroitin sulfate*. Journal of Molecular Recognition, 31(3), e2614. doi:10.1002/jmr.2614.
40. Uygün, Z., Ertugrul Uygün, H., Ermis, N., & Canbay, E. (2015). *Molecularly Imprinted Sensors — New Sensing Technologies*. Biosensors - Micro and Nanoscale Applications. doi: 10.5772/60781.
41. Ávila, M., Zougagh, M., Ríos, Á., & Escarpa, A. (2008). *Molecularly imprinted polymers for selective piezoelectric sensing of small molecules*. Trac Trends In Analytical Chemistry, 27(1), 54-65. doi: 10.1016/j.trac.2007.10.009.
42. Nriagu, J. O., & Pacyna, J. M. (1988). *Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals*. Nature, 333(6169), 134–139. doi:10.1038/333134a0.
43. Gumpu, M., Sethuraman, S., Krishnan, U., & Rayappan, J. (2015). *A review on detection of heavy metal ions in water – An electrochemical approach*. Sensors and Actuators B: Chemical, 213, 515-533. doi: 10.1016/j.snb.2015.02.122.
44. Fu, F., & Wang, Q. (2011). *Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review*. Journal Of Environmental Management, 92(3), 407-418. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.11.011.
45. Rajaganapa, V., Xavier, F., Sreekumar, D., & Mandal, P. (2011). *Heavy Metal Contamination in Soil, Water and Fodder and their Presence in Livestock and Products: A Review*. Journal of Environmental Science and Technology, 4(3), 234-249. doi: 10.3923/jest.2011.234.249.
46. Bagal-Kestwal, D., Karve, M., Kakade, B., & Pillai, V. (2008). *Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ions in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's*

sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 657-664. doi: 10.1016/j.bios.2008.06.027.

47. Merian, E., & Clarkson, T. (1991). *Metals and their compounds in the environment*. Weinheim: VCH.

48. Wani, A., Ara, A., & Usmani, J. (2015). *Lead toxicity: a review*. *Interdisciplinary Toxicology*, 8(2), 55-64. doi: 10.1515/intox-2015-0009.

49. Pounds, J., Long, G., & Rosen, J. (1991). *Cellular and Molecular Toxicity of Lead in Bone*. *Environmental Health Perspectives*, 91, 17. doi: 10.2307/3430978

50. Fen, Y., & Yunus, W. (2013). *Utilization of Chitosan-Based Sensor Thin Films for the Detection of Lead Ion by Surface Plasmon Resonance Optical Sensor*. *IEEE Sensors Journal*, 13(5), 1413-1418. doi: 10.1109/jsen.2012.2235311

51. Dietert, R., Lee, J., Hussain, I., & Piepenbrink, M. (2004). *Developmental immunotoxicology of lead*. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 198(2), 86-94. doi: 10.1016/j.taap.2003.08.020

52. Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). *Toxicity of lead: a review with recent updates*. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2), 47-58. doi: 10.2478/v10102-012-0009-2

53. World Health Organization, (2017). *International lead poisoning prevention awareness campaign*.

54. European Commission, (2006). *Regulamento (ce) n.o 1881/2006 da comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios*.

55. World Health Organization, (2011). *Background document for development of WHO guidelines for drinking water quality*.

56. European Union, (2011). *Lead standard in drinking water*. doi:10.2772/33674.

57. United States Environmental Protection Agency, (2008). *Lead and Copper rule: A quick reference guide*.

58. Health Canada, (2007). *Lead in drinking water*.

59. Deibler, K., & Basu, P. (2013). *Continuing Issues with Lead: Recent Advances in Detection*. *European Journal Of Inorganic Chemistry*, 2013(7), 1072-1072. doi: 10.1002/ejic.201300140.

60. Fu, F., & Wang, Q. (2011). *Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review*. *Journal Of Environmental Management*, 92(3), 407-418. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.11.011

61. U.S. EPA. 1994. "Method 200.8: Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry," Revision 5.4. Cincinnati, OH.
62. U.S. EPA. 1994. "Method 200.7: Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry," Revision 4.4. Cincinnati, OH.
63. U.S. EPA. 1994. "Determination of Trace Elements by Stabilized Temperature Graphite Furnace Atomic Absorption", revision 2.2, Cincinnati, OH.
64. Loehr, H., & Voegtle, F. (1985). *Chromo- and fluoroionophores. A new class of dye reagents*. Accounts of Chemical Research, 18(3), 65-72. doi: 10.1021/ar00111a001.
65. Klimant, I., & Otto, M. (1992). *A fiber optical sensor for heavy metal ions based on immobilized xylenol orange*. Mikrochimica Acta, 108(1-2), 11-17. doi: 10.1007/bf01240367.
66. de Oliveira, W., & Narayanaswamy, R. (1992). *A flow-cell optosensor for lead based on immobilized dithizone*. Talanta, 39(11), 1499-1503. doi: 10.1016/0039-9140(92)80132-w.
67. van der Veen, N., Rozniecka, E., Woldering, L., Chudy, M., Huskens, J., van Veggel, F., & Reinhoudt, D. (2001). *Highly Selective Optical-Sensing Membranes, Containing Calix[4]arene Chromoionophores, for Pb²⁺ Ions*. Chemistry - A European Journal, 7(22), 4878-4886. doi: 10.1002/1521-3765(20011119)7:22<4878::aid-chem4878>3.0.co;2-8.
68. Ensafi, A., & Isfahani, Z. (2007). *Determination of Lead Ions by an Optical Sensor Based on 2-Amino-Cyclopentene-1-Dithiocarboxylic Acid*. IEEE Sensors Journal, 7(8), 1112-1117. doi: 10.1109/jsen.2007.897942.
69. Corwin, A., & Jackson, G. (1949). *The Structure of Diphenylthiocarbazone (Dithizone)*. Journal of The American Chemical Society, 71(11), 3698-3701. doi: 10.1021/ja01179a034.
70. White, W. (1936). *Dithizone as an analytical reagent*. Journal of Chemical Education, 13(8), 369. doi: 10.1021/ed013p369.
71. Ntoi, L. L. A., Buitendach, B. E., & von Eschwege, K. G. (2017). *Seven Chromisms Associated with Dithizone*. The Journal of Physical Chemistry A, 121(48), 9243–9251. doi:10.1021/acs.jpca.7b09490.
72. Hosmane, N. S. (2017). *Review of Bonding Theories for d -Block Metal Complexes*. Advanced Inorganic Chemistry, 89–114. doi:10.1016/b978-0-12-801982-5.00006-0.

73. Zhang, G., Qu, R., Sun, C., Ji, C., Chen, H., Wang, C., & Niu, Y. (2008). *Adsorption for metal ions of chitosan coated cotton fiber*. Journal of Applied Polymer Science, 110(4), 2321–2327. doi:10.1002/app.27515.
74. Tran, H. V., Tran, L. D., & Nguyen, T. N. (2010). *Preparation of chitosan/magnetite composite beads and their application for removal of Pb(II) and Ni(II) from aqueous solution*. Materials Science and Engineering: C, 30(2), 304–310. doi:10.1016/j.msec.2009.11.008.
75. Sun, X., Peng, B., Ji, Y., Chen, J., & Li, D. (2009). *Chitosan(chitin)/cellulose composite biosorbents prepared using ionic liquid for heavy metal ions adsorption*. AIChE Journal, 55(8), 2062–2069. doi:10.1002/aic.11797.
76. Wan, M.-W., Kan, C.-C., Rogel, B. D., & Dalida, M. L. P. (2010). *Adsorption of copper (II) and lead (II) ions from aqueous solution on chitosan-coated sand*. Carbohydrate Polymers, 80(3), 891–899. doi:10.1016/j.carbpol.2009.12.048.
77. Ferreira, V. R. A., Azenha, M., Pinto, A., Santos, P., Pereira, C., & Silva, A. (2019). *Development of mesoporous polysaccharide/sol-gel composites with two different templating agents: Surfactants and choline chloride-based deep eutectic solvents*. Express Polymer Letters, 13(3), 261-275. doi: 10.3144/expresspolymlett.2019.22
78. Ferreira, V., Azenha, M., Pereira, C., & Fernando Silva, A. (2017). *Preparation and evaluation of Pb(II)-imprinted fucoidan-based sorbents*. Reactive and Functional Polymers, 115, 53-62. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2017.04.001.
79. Güney, O., Yılmaz, Y., & Pekcan, Ö. (2002). *Metal ion templated chemosensor for metal ions based on fluorescence quenching*. Sensors and Actuators B: Chemical, 85(1-2), 86-89. doi: 10.1016/s0925-4005(02)00057-6.
80. Ng, S., & Narayanaswamy, R. (2006). *Fluorescence sensor using a molecularly imprinted polymer as a recognition receptor for the detection of aluminium ions in aqueous media*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386(5), 1235-1244. doi: 10.1007/s00216-006-0736-3.
81. Al-Kindy, S., Badía, R., & Díaz-García, M. (2002). *Fluorimetric Monitoring of Molecular Imprinted Polymer Recognition Events for Aluminium*. Analytical Letters, 35(11), 1763-1774. doi: 10.1081/al-120013581.
82. James, D., Gladis, J., Pandey, A., Naidu, G., & Prasada Rao, T. (.). *Design of two-dimensional biomimetic uranyl optrode and its application to the analysis of natural waters*. Talanta, 74(5), 1420-1427. doi: 10.1016/j.talanta.2007.09.019.

83. Shawky, H. (2009). *Synthesis of ion-imprinting chitosan/PVA crosslinked membrane for selective removal of Ag(II)*. Journal of Applied Polymer Science, 114(5), 2608-2615. doi: 10.1002/app.30816.
84. Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. Photosynthesis Research, 101(2-3), 157–170. doi:10.1007/s11120-009-9439-x.
85. Introduction. (2005). *Analytical Techniques In The Sciences*, 1-13. doi: 10.1002/0470011149.ch1.
86. Duygu, D., Baykal, T. and Açıkgöz, Đ. (2007). *Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies*. G.U. Journal of Science.
87. Kazarian, S. and Chan, K. (2006). *Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1758(7), pp.858-867.
88. Coats, A., & Redfern, J. (1963). *Thermogravimetric analysis. A review*. The Analyst, 88(1053), 906. doi: 10.1039/an9638800906.
89. Maurer, J. J. (1969). *Application of Differential Thermal Analysis and Thermogravimetric Analysis to Elastomer Systems*. Rubber Chemistry and Technology, 42(1), 110–158. doi:10.5254/1.3539205.
90. LAGALANTE, A. (2004). *Atomic Absorption Spectroscopy: A Tutorial Review**. Applied Spectroscopy Reviews, 34(3), 173-189. doi: 10.1081/asr-100100844.
91. Garca, R., & P., A. (2012). *Atomic Absorption Spectrometry (AAS)*. Atomic Absorption Spectroscopy. doi:10.5772/25925.
92. Fernández, B., Lobo, L., & Pereiro, R. (2018). *Atomic Absorption Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Capabilities*. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.14116-2.
93. Owen T. (1996). *Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy - A Primer*. Germany, Hewlett Packard.
94. Mujahid, A., & Dickert, F. L. (2012). *Molecularly Imprinted Polymers for Sensors*. Molecularly Imprinted Sensors, 125–159. doi:10.1016/b978-0-444-56331-6.00006-2.
95. Yao, Z., & -Ge Wu, H. (2010). *Characterization Of Chitosan-chondroitin Sulfate Blended Membranes And Effects On The Growth Of Corneal Cells*. Advanced Materials Letters, 1(1), 67-74. doi: 10.5185/amlett.2010.4113
96. Danish, Muhammad & Mumtaz, Muhammad & Fakhar, Mahpara & Rashid, Umer. (2016). *Response Surface Methodology: An Imperative Tool for the Optimized Purification of the Residual Glycerol from Biodiesel Production Process*. Chiang Mai Journal of Science. 44.

97. Shankar, S., & Rhim, J. (2018). *Preparation of sulfur nanoparticle-incorporated antimicrobial chitosan films*. Food Hydrocolloids, 82, 116-123. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.03.054.
98. Abdel-Gawad, K., Hifney, A., Fawzy, M., & Gomaa, M. (2017). *Technology optimization of chitosan production from Aspergillus niger biomass and its functional activities*. Food Hydrocolloids, 63, 593-601. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.10.001.
99. Crouzier, T., & Picart, C. (2009). *Ion Pairing and Hydration in Polyelectrolyte Multilayer Films Containing Polysaccharides*. Biomacromolecules, 10(2), 433-442. doi: 10.1021/bm8012378.
100. Lim, S., Wan Aida, W., Maskat, M., Mamot, S., Ropien, J., & Mazita Mohd, D. (2014). *Isolation and antioxidant capacity of fucoïdan from selected Malaysian seaweeds*. Food Hydrocolloids, 42, 280-288. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.03.007.
101. Khan, A., Khalid, H., Sarfraz, Z., Khan, M., Iqbal, J., & Muhammad, N. et al. (2016). *Vibrational spectroscopy of selective dental restorative materials*. Applied Spectroscopy Reviews, 52(6), 507-540. doi: 10.1080/05704928.2016.1244069.
102. Klapiszewski, L., Szalaty, T., (2016). *Activated lignin and aminosilane-grafted silica as precursors in hybrid material production*. Physicochemical Problems of Mineral Processing, 52(1):459-478. doi: 10.5277/ppmp160138.
103. Corazzari, I., Nisticò, R., Turci, F., Faga, M., Franzoso, F., Tabasso, S., & Magnacca, G. (2015). *Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity*. Polymer Degradation and Stability, 112, 1-9. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.006.
104. Fajardo, A., Lopes, L., Pereira, A., Rubira, A., & Muniz, E. (2012). *Polyelectrolyte complexes based on pectin-NH₂ and chondroitin sulfate*. Carbohydrate Polymers, 87(3), 1950-1955. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.096.
105. Vasconcelos Oliveira, A., de Abreu Feitosa, V., de Oliveira, J., Coelho, A., de Araújo P. Vieira, L., & de Assis Rocha da Silva, F. et al. (2017). *Characteristics of Chondroitin Sulfate Extracted of Tilapia (Oreochromis niloticus) Processing*. Procedia Engineering, 200, 193-199. doi: 10.1016/j.proeng.2017.07.028.
106. Rodriguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). *Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoïdan) from brown seaweed*. Carbohydrate Polymers, 86(3), 1137-1144. doi:10.1016/j.carbpol.2011.06.006.

107. Azmi, N., & Low, S., *Investigating film structure of membrane-based colorimetric sensor for heavy metal detection*, Journal Of Water Process Engineering, 15, 37-42, 2017. doi: 10.1016/j.jwpe.2016.04.004.