

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**“DESENVOLVIMENTO DE SENSORES
NANOESTRUTURADOS PARA ANÁLISE DE
TETRACICLINA EM LEITE”**

São Carlos
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA

**“DESENVOLVIMENTO DE SENSORES NANOESTRUTURADOS PARA
ANÁLISE DE TETRACICLINA EM LEITE”**

Vanessa Priscila Scagion

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia
como requisito parcial à obtenção do título de
MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

Orientadores: Dr. Daniel Souza Correa
Dr. Marcos David Ferreira

Agência Financiadora: CAPES

São Carlos
2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S278ds

Scagion, Vanessa Priscila.

Desenvolvimento de sensores nanoestruturados para
análise de tetraciclina em leite / Vanessa Priscila Scagion. --
São Carlos : UFSCar, 2015.
58 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

1. Biotecnologia. 2. Sensor. 3. Eletrofição. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Vanessa Priscila Scagion, realizada em 13/02/2015:

Daniel Souza Correa

Prof. Dr. Daniel Souza Correa
Embrapa

Cristiane Sanchez Farinas

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas
UFSCar

Antonio Riul Junior

Prof. Dr. Antonio Riul Junior
UNICAMP

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
por todo apoio, ensinamentos e amor.*

Agradecimentos

À Deus por ter me dado tudo necessário.

À meus pais e a minha família pelo apoio, amor e dedicação incondicional.

Ao Prof. Dr. Daniel Souza Correa por acreditar em mim e no nosso trabalho, pela amizade, ensinamentos, dedicação, pela orientação e pela paciência.

Ao Prof. Dr. Marcos David Ferreira pela oportunidade, ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. Juliano Oliveira por ter acreditado em mim e em nosso trabalho, pelos ensinamentos, pela dedicação, pelas discussões via skype, pela amizade e pelo apoio em momentos desesperadores.

A Dr^a Viviane Grassi e amiga Lilian Lima que apresentaram a Embrapa e a carreira científica, pela amizade e ensinamentos.

Aos amigos Camila, Gláucia, Pedro, Luiz, Adriana, Camila C., Cristiane, Alexandra, Francys, Elaine P., Mattêo, Viviane, Luiza e Heloisa por me darem apoio em momentos conturbados, por me fazerem acreditar que valia a pena.

Aos amigos à distância Leonardo, Makoto e Vitor que sempre se fizeram presentes, em todos os momentos.

À Karine pela amizade, ajuda e por acreditar no nosso trabalho.

Aos amigos Rafa, Stanley, Lilian, Leo, Cris, Cá por tornar o trabalho de fim de semana e feriados mais divertido.

Aos funcionários e amigos da Embrapa Elaine, Lilica, Vanessa, Anny, Gabi, Jéssica, Sarah Silviane, Renê, Paulinho, Edílson, Valentim, Ferrazini, Luiz Henrique, Márcio, Jorge e Godoy.

Aos amigos do Grupo de Sensores Danilo, Sarah, Aline, Caio, Drica, Marcos, Rafa e Kelcilene.

RESUMO

O trabalho versa sobre a utilização de dois arranjos de sensores químicos do tipo língua eletrônica para avaliação da qualidade de leite UHT (pasteurização por *Ultra High Temperature*) visando à detecção do antibiótico tetraciclina. Cada unidade sensorial da língua eletrônica foi composta por eletrodos interdigitados de ouro em substratos de vidro, sobre os quais foram depositadas nanofibras de Poliamida 6 (PA6) e suas blendas com polianilina (PAni) obtidas pela técnica de eletrofiação. As nanofibras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX), espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho (FTIR), espectroscopia vibracional Raman, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG/DTG). A análise das amostras de leite com a língua eletrônica foi feita utilizando-se um analisador de impedância para coleta das medidas de capacitância e de resistência elétrica na frequência de 1 kHz. Empregou-se como ferramenta quimiométrica a técnica de Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) para verificar a capacidade do conjunto de sensores em distinguir diferentes tipos de leite, bem como aqueles contaminados com tetraciclina. Os resultados demonstraram que a utilização da PAni na formulação empregada para obtenção das fibras de PAni/PA6 alteraram discretamente algumas das propriedades físicas químicas em relação à fibra sem PAni. Porém, ao se comparar o diâmetro das fibras da blenda em relação às fibras de PA6, observa-se que o acréscimo da PAni diminuiu consideravelmente o diâmetro destas. O sistema desenvolvido neste trabalho é uma promissora metodologia para a distinção e classificação de amostras de leite em relação ao percentual de gordura e à detecção de resíduos de tetraciclina, sendo capaz de detectar amostras contaminadas com 1ppb de tetraciclina, indiferente do percentual de gordura do leite analisado.

ABSTRACT

This work deals with the application of two arrays of sensors composing an electronic tongue for the quality evaluation of UHT-type milk, with the specific aim of detecting the antibiotic tetracycline in this dairy product. The electronic tongue device was made up by sensing units composed by gold interdigitated electrodes assembled onto glass substrates. Polyamide 6 (PA6) nanofibers and PA6/polyaniline (PAni) blends were deposited on the electrodes via the electrospinning technique. The nanofibers were characterized by means of scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA/DTG). The electronic tongue measurements were carried out using an impedance analyzer to collect capacitance and resistance data at 1 KHz. As chemometric tool we employed the Principal Component Analysis (PCA) technique to verify the efficiency of the electrospinning nanofibers-based electronic tongue in distinguishing different types of milk, as well as those contaminated by tetracycline. The results showed that the use of PAni for obtaining polymer blend fibers caused some small changes on the physical chemical properties compared to the neat PA6 fiber. However, PAni addition allowed a great reduction on the fiber diameter. Our results demonstrated that the electronic tongue system is a potential methodology to be used for classifying milk samples, in terms of fat content and quality regarding the presence of antibiotic tetracycline. The electronic tongue system system was able to detect milk samples contaminated up to 1ppb of tetracycline, regardless of milk fat content.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Estrutura química – Grupo tetraciclinas.	3
Figura 2.2 Mecanismo de ação da tetraciclina. Adaptada de Pereira-Maia, E. C., et al., 2010. [26].....	4
Figura 2.3 Estrutura química da PA6.	5
Figura 2.4 Estruturas químicas evidenciando alguns estados de oxidação da Pani. (a) Estado totalmente reduzido; (b) Totalmente oxidado; (c) e (d) Parcialmente oxidado.	7
Figura 2.5 Etapas do processo de eletrofiação. Imagem retirada de Costa, R. G. F., et al, 2012. [59]	8
Figura 4.1 Fluxograma referente as etapas de execução do trabalho de dissertação.	13
Figura 4.2 Esquema do aparato experimental da eletrofiação e em destaque o Cone de Taylor. Imagem retirada de Ke, P. et al, 2014. [102]	15
Figura 4.3 Preparação do eletrodo para eletrofiação.....	16
Figura 4.4 Organograma das amostras de leite analisadas.....	20
Figura 4.5 (a) Foto do eletrodo interdigitado . (b) Figura esquemática dos IMEs de ouro, mostrando suas principais características geométricas. Imagem (b) retirada de Manzoli, A. et al,2014. [104].....	22
Figura 5.1 Micrografias das fibras com variação da concentração de PA6 (% m/m): (a) 5%; (b) 10%; (c) 15%; (d) 20% e (e) 25%.	26
Figura 5.2 Micrografias das nanofibras da blenda polimérica de PA6/PAni com diferentes concentrações de PAni. (a) 0%; (b) 0,25%; (c) 0,5%; (d) 1%; (e) 2,5%; (f) 5%.....	28
Figura 5.3 Espectros de FTIR das amostras PAni, PA6 e PA6/PAni.....	29
Figura 5.4 Espectro RAMAN das fibras das blendas de PA6/PAni.....	30
Figura 5.5 Difractogramas das nanofibras de PA 6 e das blendas poliméricas de PA 6/PAni.	31
Figura 5.6 Curvas de DSC das amostras das fibras de PA6 e PA6/PAni. Em destaque é mostrado a diferença entre uma amostra com 0,25% de PAni e outra com 5% de PAni.	32
Figura 5.7 Curvas termogravimétricas das blendas de PA6/PAni.	34
Figura 5.8 Micrografias dos eletrodos modificados com nanofibras em diferentes tempos. (a) 30 segundos; (b) 45 segundos; (c) 1 minuto; (d) 5 minutos e (e) 10 minutos.	35
Figura 5.9 Gráfico do comportamento elétrico das unidades sensoriais em relação ao tempo de deposição das mantas de fibras de PA6. (a) Capacitância em função da frequência; (b) Resistência em função da frequência.	36
Figura 5.10 Esquema da visão lateral do eletrodo com fibras depositadas por (a) 30 s, (b) 45 s e (e) 10 min.	37

Figura 5. 11 Gráficos do comportamento elétrico das unidades sensoriais com nanofibras em água destilada: (a) Variação da resistência em função da frequência; (b) Variação da capacitância em função da frequência.	38
Figura 5.12 Gráfico de PCA das 9 amostras de leite analisadas pela LE.....	40
Figura 5.13 PCA das amostras de água destilada contaminadas com tetraciclina.....	41
Figura 5.14 PCAs dos leites integrais (a) contendo todos os leites integrais não contaminados (marca 1,2,3 e 4(controle)) e leites contaminados (leites da marca 4 contaminados) e, (b) contendo somente o leite da marca 4 utilizado como controle e suas amostras contaminadas (leites da marca 4 contaminados).	43
Figura 5.15 PCAs dos leites semi desnatados (a) contendo todos os leites semi desnatados não contaminados (marca 1,2,3 e 4(controle)) e leites contaminados (leites da marca 4 contaminados) e, (b) contendo somente o leite da marca 4 utilizado como controle e suas amostras contaminadas (leites da marca 4 contaminados).	45
Figura 5.16 PCAs dos leites semi desnatados (a) contendo todos os leites semi desnatados não contaminados (marca 1,2,3 e 4(controle)) e leites contaminados (leites da marca 4 contaminados) e, (b) contendo somente o leite da marca 4 utilizado como controle e suas amostras contaminadas (leites da marca 4 contaminados).	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.I Soluções poliméricas eletrofiadas.....	14
Tabela 4.II Classificação dos leites UHT segundo teor de gordura.	20
Tabela 4.III Informações nutricionais dos leites empregados.	21
Tabela 4.IV Dimensões dos eletrodo interdigitado mostrado da Figura 4.5...	22
Tabela 4.V Experimentos com leites contaminados com tetraciclina.....	24
Tabela 5.I Influência da concentração de PA6 no diâmetro das fibras.	26
Tabela 5.II Diâmetros das nanofibras PA6/PAni.....	27
Tabela 5.III Atribuição das bandas vibracionais observadas no espectro IR.	29
Tabela 5.IV Atribuição das bandas vibracionais observadas no espectro RAMAN.....	30
Tabela 5.V Valores das análises de DSC e TGA.....	33
Tabela 5.VI Comparação das técnicas de detecção de tetraciclina.....	48

LISTA DE ABREVIações

DRX.....	Difração de raiosX
DSC.....	Calorimetria diferencial de varredura
FSS.....	Fiação por sopro em solução
FTIR.....	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
PA 6	Poli(amida) 6
TGA.....	Análise termogravimétrica
HFIP.....	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
MEV.....	Microscopia Eletrônica de Varredura
PAni.....	Poli(anilina)
UHT.....	Ultra high temperature
I.....	Leite integral
S.....	Leite-semi desnatado
D.....	Leite desnatado
IME.....	Microeletrodo interdigitado
PCA.....	Análise de componentes principais
PC1.....	Componente principal 1
PC2.....	Componente principal 2
RNA's	Redes neurais artificiais
LE.....	Língua eletrônica
BE.....	Base esmeraldina
FDA.....	<i>US Food and Drug Administration</i>
EU.....	<i>European Union</i>
PNCRB.....	Plano nacional de controle de resíduos biológicos em produtos de origem animal
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
TC.....	Tetraciclina
MS.....	Espectroscopia de massa
FL.....	Fluorescência
CE.....	Eletroforese capilar
HPLC.....	Cromatografia líquida de alta performance

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Tetraciclina	3
2.2	Composição da camada ativa das unidades sensoriais	4
2.2.1	Poliamida 6 / Nylon 6 (PA6).....	4
2.2.2	Polímeros condutores.....	5
2.2.2.1	Polianilina (PAni).....	6
2.3	Eletrofiação.....	7
2.4	Língua eletrônica	9
2.4.1	Método estatístico	10
3	OBJETIVO	12
4	MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1	Etapa I	13
4.1.1	Materiais.....	13
4.1.2	Soluções poliméricas para obtenção das fibras	14
4.1.3	Eletrofiação	14
4.1.4	Caracterização das nanofibras de PA6 e PA6/PAni.....	16
4.2	Etapa II	18
4.2.1	Amostras de leite puro e contaminadas com tetraciclina	18
4.2.2	Análise utilizando o sistema Língua Eletrônica	21
4.2.3	Análise estatística dos resultados obtidos.....	24
5.1	ETAPA I	25
5.1.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS FIBRAS	25
5.1.1.1	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PA6	25
5.1.6	Caracterização elétrica.....	37
5.2	Etapa II	39

5.2.1	Medidas com a língua eletrônica e análise das componentes principais	39
6	CONCLUSÕES	49
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	50
8	PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTES AO TRABALHO DE MESTRADO	51
8.1	Resumos em anais de congresso.....	51
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento muito importante na dieta do ser humano, especialmente durante o período da infância, devido a seu elevado valor nutricional atribuído à grande quantidade de aminoácidos essenciais e vitaminas. Este também é rico em cálcio, um dos principais minerais que ajudam na prevenção da osteoporose. [1, 2] Além de seu alto valor nutricional, este é de grande importância econômica para alguns países, dentre estes temos o Brasil, que se destaca como o sexto maior produtor de leite do mundo, cuja produção em 2013 atingiu cerca de 35 bilhões de litros. Estes dados evidenciam a grande importância deste produto no agronegócio brasileiro, que agrega mais de seis bilhões à economia nacional. [3]

Neste contexto, a qualidade do leite na dieta alimentar é de extrema importância, sendo esta definida por parâmetros como composição química, características físico-químicas e de higiene. A presença e os teores de proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas determinam a qualidade da composição, que, por sua vez, é influenciada pela alimentação, manejo, genética e a raça do animal. Alterações nesses parâmetros podem gerar mudanças no sabor e odor do leite. A fim de avaliar sua qualidade durante a análise também são definidos outros parâmetros de qualidade, tais como: contagem de bactérias, micro-organismos patogênicos, células somáticas, conservantes químicos, pesticidas e resíduos de antibióticos. [4-12]

Dentre os resíduos de compostos utilizados na pecuária leiteira, podemos destacar a tetraciclina. As tetraciclinas são antibióticos utilizados no tratamento de algumas doenças infecciosas (como a mastite) que acometem o gado leiteiro. O problema no uso deste antibiótico está relacionado à sua presença residual no leite, decorrente da má administração do fármaco durante o tratamento animal. Os resíduos de tetraciclina em leite podem gerar prejuízos econômicos, oriundos da inibição de fermentos em produtos lácteos que utilizam o leite como matéria prima, bem como malefícios para a saúde da população. Neste caso, esses resíduos podem desencadear reações alérgicas, danos ao fígado, amarelamento dos dentes, distúrbios gastrointestinais além de tornar o agente infeccioso mais resistente ao antibiótico, diminuindo sua eficácia. [10, 13, 14]

Atualmente, existem diversos métodos utilizados para a detecção de tetraciclina em leite, que incluem kits comerciais para a identificação do antibiótico durante a ordenha, bem como análises mais criteriosas em laboratório. Dentre as técnicas laboratoriais podemos citar a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (CE), fluorescência (FL), espectroscopia de massa (MS), e sensores. [14-22]. Estes métodos analíticos são quantitativos e qualitativos, tendo seus limites de detecção variando de 1 a 100 ppb, sendo os métodos mais usados o HPLC e CE.

Devido ao alto custo e demanda por mão de obra altamente especializada para operação dos equipamentos, faz-se necessária à busca por metodologias de análise. Neste contexto, uma alternativa relevante é o sistema língua eletrônica, uma técnica bastante promissora para análise de diversos líquidos, como o leite, a qual possibilita uma análise qualitativa precisa e rápida sobre a presença de contaminantes. O sistema língua eletrônica emprega um conjunto de unidades sensoriais não específicas para coleta e reconhecimento do padrão global dos elementos presentes no líquido, sem a necessidade da presença de um sensor específico para cada tipo de substância. Desta maneira, esta é uma técnica com grande vantagem na caracterização de líquidos complexos, como o leite [5]. Este tipo de sensor é de fácil manuseio e possui uma elevada sensibilidade, o que a torna útil para análises qualitativas preliminares.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma língua eletrônica composta por unidades sensoriais contendo eletrodos interdigitados metálicos modificados com nanofibras poliméricas para a análise de resíduos de tetraciclina em amostras de leite UHT.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tetraciclina

A tetraciclina (TC) é um antibiótico pertencente ao grupo de antibióticos naturais ou semi-sintéticos, de mesmo nome, que possuem em sua estrutura química quatro anéis cíclicos conjugados. Os antibióticos deste grupo se diferenciam de acordo com a posição de seus grupos funcionais [23] (Figura 2.1).

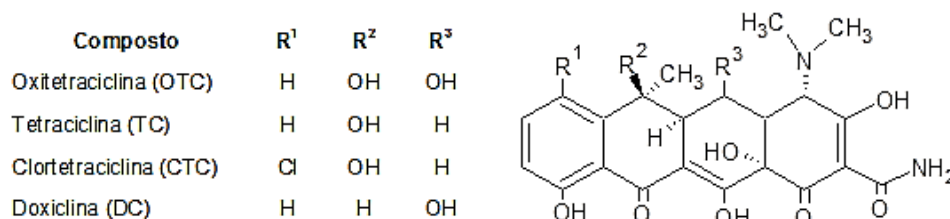


Figura 2.1 Estrutura química – Grupo tetraciclina.

A tetraciclina (TC) possui uma ampla atividade bactericida contra micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e alguns protozoários. Ela é bastante empregada por possuir um largo espectro de ação, baixa toxicidade, baixo custo, podendo ser administrada via oral, além de apresentar poucos efeitos colaterais. Com sua utilização em larga escala, tanto no tratamento de infecções quanto como complemento alimentar, alguns micro-organismos adquiriram resistência a este antibiótico, diminuindo a abrangência de seu uso, mas ainda assim, estima-se que anualmente, no mundo, sejam consumidas 5.000 toneladas de tetraciclina [23, 24]. A TC pertence à classe dos antibióticos conhecida como bacteriostático, que são responsáveis por deter o crescimento da bactéria, ou seja, impedem a síntese proteica desta. Na Figura 2.2 é apresentado o mecanismo de ação da tetraciclina, que age na subunidade 30S do ribossomo do micro-organismo infeccioso, impedindo a ligação do aminoácido no ribossomo e, conseqüentemente, bloqueando a continuidade da síntese proteica. [15-17, 25]

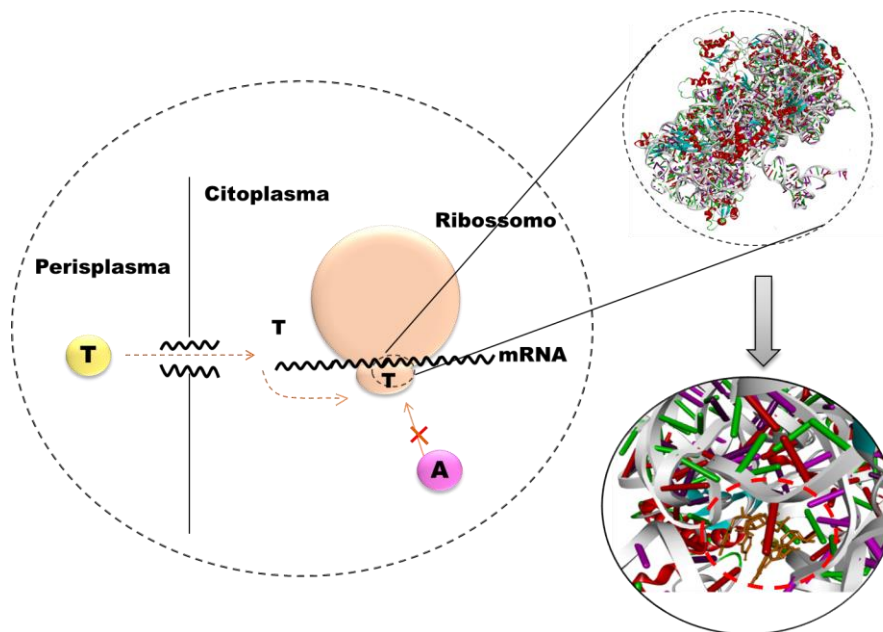


Figura 2.2 Mecanismo de ação da tetraciclina. Adaptada de Pereira-Maia, E. C., et al., 2010. [26]

A taxa metabólica da tetraciclina em vacas leiteiras é por volta de 25-75%, não sendo necessário o uso de uma dosagem acima do recomendado para eficiência do antibiótico. A tetraciclina não metabolizada pode ser excretada pelo animal através das glândulas mamárias, contaminando seu leite. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em seu Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), o valor máximo de tetraciclina admitido no leite é de 100 ppb, cujo valor é igual ao adotado pela *European Union* (EU), enquanto o *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) permite um valor de 300 ppb. [10, 25, 27-29] Existem Kits comerciais de medição (Tetracycline SNAP[®] Test, Idexx Laboratories, Maine, EUA, ECO Teste BT[®], ECO Diagnóstica, Nova Lima, Brasil) de tetraciclina, que podem ser utilizados em campo com limite de detecção por volta de 100 ppb. [15, 16, 25, 30]

2.2 Composição da camada ativa das unidades sensoriais

2.2.1 Poliamida 6 / Nylon 6 (PA6)

A primeira poliamida foi sintetizada pelo químico Wallace Hume Carothers, em 1935, na Dupont, sendo inicialmente utilizado como fibras sintéticas e, posteriormente, adquirindo novas utilidades. As poliamidas são

formadas por segmentos de polietileno (CH₂)_n intercalados por unidades peptídicas (NH-CO), responsáveis pela formação de ligações hidrogênio entre as cadeias poliméricas [31].

Dentre as diferentes poliamidas existentes, a poliamida 6 (Figura 2.3) e a poliamida 6.6 são as mais empregadas no setor automobilístico e têxtil [31, 32]. Esta é um termoplástico de engenharia semicristalino que possui alta resistência mecânica, devido à formação das ligações hidrogênio mencionada acima. Sua estrutura cristalina possui duas fases, conhecidas como α e γ [33], sendo que sua estrutura pode sofrer alterações dependendo das condições de processamento e cristalização.

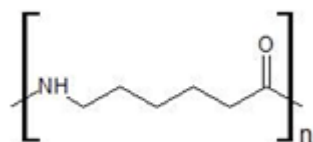


Figura 2.3 Estrutura química da PA6.

Nanofibras de PA6 possuem diversas aplicações, incluindo a área de sensores [34, 35]. Por exemplo, Hong, K.H. et al, 2013, descrevem a utilização de um compósito de PA6 e PANi como sensor para amônia [36], enquanto que no trabalho de Fuenmayor, A.C. et al, 2014 é reportada a aplicação de nanofibras de PA6 na determinação de ácido ascórbico em frutas. [37, 38]

2.2.2 Polímeros condutores

O início das pesquisas com polímeros condutores se iniciou com a descoberta do poliacetileno, nos anos de 1970, e desde então as pesquisas nessa área cresceram enormemente devido à diversidade de aplicações. Como exemplo, podemos citar seu uso como inibidores de corrosão, revestimento anti-estático, diodos emissores de luz, células solares e no desenvolvimento de sensores. [39-44] Os polímeros conjugados possuem alternância de ligações simples e duplas ao longo da cadeia principal, que permite uma grande mobilidade (deslocalização) dos elétrons, fazendo com que estes materiais se comportem como semi-condutores e em alguns casos (dependendo da dopagem) como condutores. As principais vantagens da utilização destes materiais como camadas sensoativas são: (a) diversidade e

disponibilidade de polímeros condutores; (b) boa resposta a uma vasta quantidade de analitos; (c) espécies biologicamente ativas podem ser incorporadas para fabricação de biossensores, e (d) baixa temperatura de processamento para produção de filmes. [43]

Dessa maneira, os polímeros condutores são largamente utilizados em sensores químicos devido à sua capacidade de alterar, de maneira reversível, seus níveis de condutividade elétrica, quando expostos a diferentes substâncias químicas e ambientes diferentes. [45]

2.2.2.1 Polianilina (PAni)

A PAni é um dos polímeros condutores mais estudados e pode ser obtida da polimerização da anilina e possui alta estabilidade química, facilidade de síntese e dopagem [46, 47], baixo custo, propriedades eletrônicas bem definidas, efeito eletrocromático [48] e condutividade elétrica moderadamente alta [49, 50]. A sua dopagem pode ser controlada por meio da mudança do pH do meio, isto é, a forma parcialmente oxidada esmeraldina é reversivelmente alterada entre as formas isolante da base esmeraldina (BE) e condutora do sal esmeraldina (SE), sendo a primeira encontrada em pH básico e a segunda, em pH ácido. [51-54]

A Figura 2.4 ilustra as estruturas químicas sob três diferentes estados de oxidação da PAni, onde n representa o grau de polimerização. O grau de oxidação da PAni pode variar de 1 a 0, que representam a forma totalmente reduzida e a totalmente oxidada, respectivamente. Para cada grau de oxidação, a polianilina recebe um nome diferente. Para os graus de oxidação iguais a 1; 0,75; 0,50; 0,25 e 0 temos: a leucoesmeraldina, protoesmeraldina, esmeraldina, nigranilina e pernigranilina, respectivamente. [44, 55] Devido a estas características, este polímero se enquadra em diversas aplicações, tais como sensores de paladar artificial. [56, 57]

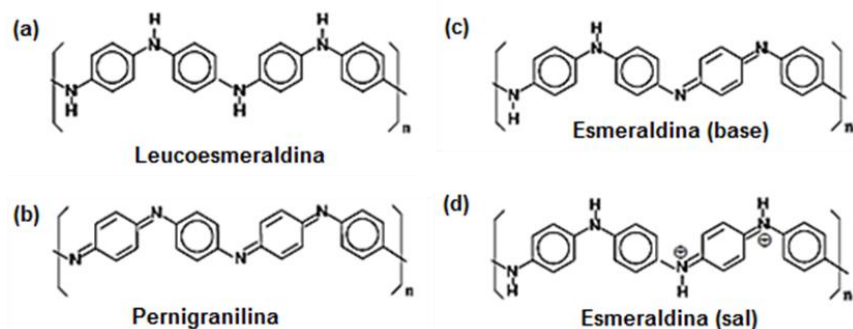


Figura 2.4 Estruturas químicas evidenciando alguns estados de oxidação da Pani. (a) Estado totalmente reduzido; (b) Totalmente oxidado; (c) e (d) Parcialmente oxidado.

2.3 Eletrofiação

Materiais poliméricos na escala nanométrica tem grande potencial de aplicação como camada ativa em sensores químicos, que podem ser empregados tanto na forma de filmes finos como de nanofibras. Para a obtenção de micro e nanofibras poliméricas são utilizadas algumas técnicas, como a eletrofiação e a fiação por sopro. Dentre estas, a eletrofiação é usualmente mais empregada em sensores devido à ampla variedade de materiais que podem ser utilizados e a uniformidade das fibras obtidas. [35, 58].

A eletrofiação pode ser definida como um fenômeno eletro-hidro-dinâmico que produz fibras em escala micro e nanométrica. A eletrofiação foi redescoberta em 1995 por Reneker e, desde então, se tem notado um aumento nas pesquisas envolvendo essa técnica para obtenção de materiais nanoestruturados. [59] As nanofibras poliméricas obtidas por este método apresentam uma elevada área superficial, assim como grande flexibilidade mecânica, e o processo de produção permite controle de sua morfologia, o que torna estes materiais excelentes opções para aplicações tecnológicas.

O processo de eletrofiação consiste na aplicação de um elevado potencial elétrico na gota de uma solução polimérica contida em um capilar. A aplicação deste potencial carrega eletricamente a gota da solução polimérica, e quando a força de repulsão eletrostática supera a força de tensão superficial, tem-se a geração de um jato. Este jato é direcionado para um coletor metálico, sendo que durante o trajeto ocorre a evaporação do

solvente e as elevadas taxas de estiramento da solução promovem a formação das nanofibras [8, 45].

A Figura 2.5 ilustra as etapas de formação das fibras pela técnica de eletrospiação. O cone de Taylor é o ponto inicial de formação das fibras, nele temos a gota da solução polimérica, que está sendo submetida a um potencial elétrico, sofrendo um estiramento e dando origem ao formato alongado. A partir desse momento temos o início do estiramento da solução, durante o qual ocorre a evaporação do solvente e formação das fibras. [60-62]

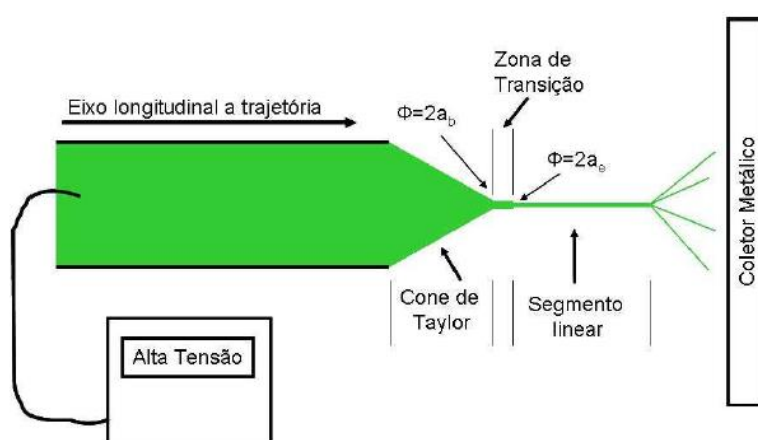


Figura 2.5 Etapas do processo de eletrospiação. Imagem retirada de Costa, R. G. F., et al, 2012. [59]

A obtenção das nanofibras pode ser influenciada por propriedades da solução polimérica (viscosidade, condutividade, elasticidade e tensão superficial) e por variáveis do processo como potencial aplicado, distância entre a agulha e o coletor (distância de trabalho) e taxa de ejeção da solução [59]. Esses parâmetros também são responsáveis pela qualidade da fibra, ou seja, a diminuição de defeitos do tipo *beads* e variações no diâmetro. Desta maneira, é possível obter diversos tipos de fibras, de acordo com a aplicação final, fazendo-se pequenos ajustes destas variáveis.

A utilização de nanofibras como camada ativa para aplicação em sensores e biossensores é promissora devido à elevada área superficial de contato do eletrodo, o que aumenta sua sensibilidade. [35, 63-65] Micro e nanofibras podem ser utilizadas sozinhas ou em conjunto com outros materiais que podem aumentar a sua condutividade e, conseqüentemente,

melhorar o desempenho do sensor. [66-72] Neste contexto, é reportada na literatura a utilização de nanofibras de PAni e PA6, para o aumento da sensibilidade de sensores.[33, 73]

2.4 Língua eletrônica

A língua humana é o órgão responsável por ajudar no processo de digestão, fornecendo informações sobre o gosto, textura e temperatura dos alimentos. A língua, através do conceito de seletividade global, é capaz de identificar sabores básicos, que são: azedo, doce, salgado, amargo e umami. Esta percepção é possível devido à presença de receptores gustativos presentes na língua, que são capazes de se ligar a substâncias químicas específicas presentes nos alimentos (íons e moléculas). Por meio destes estímulos, os receptores geram sinais elétricos que são transmitidos ao cérebro e interpretados por ele. [74]

De maneira a mimetizar a língua humana, foi desenvolvida a língua eletrônica, que é um sistema formado por diversas unidades sensoriais que juntas fornecem uma resposta global sobre o analito. A língua eletrônica é composta por quatro elementos básicos: (1) Célula de medida utilizada para introduzir o analito em contato com os sensores químicos; (2) Arranjo de sensores, que é composto por distintas unidades sensoriais, sendo que cada uma possui certo grau de sensibilidade a íons ou moléculas, porém não específicas, originando assim uma “impressão digital” característica para cada analito; o sistema de controle (3) e aquisição eletrônica de dados (4), consistindo de um dispositivo que capta os sinais dos sensores, como variação na condutividade ou resistividade, e que por meio de um conversor transforma os sinais em valores numéricos relativos às propriedades medidas [75-77].

A língua eletrônica vem sendo cada vez mais utilizada na avaliação da qualidade de diversos produtos como cervejas [78], vinhos [79], águas [80] e na detecção de pesticidas e fármacos em amostras líquidas [81, 82]. O princípio de detecção desta pode variar sendo as principais: a potenciométrica, a amperométrica, por voltametria cíclica [75, 83] e a impedimétrica [84]. A língua eletrônica baseada em espectroscopia de impedância, a qual é usada neste trabalho, destaca-se perante as outras

devido a não necessidade do material da unidade sensorial ser eletroativo, e também por dispensar a utilização de eletrodo de referência [85].

As unidades sensoriais que compõem a língua eletrônica podem se diferenciar por meio da modificação da superfície do eletrodo depositando camadas de filmes ultrafinos, que aumentam a sensibilidade e seletividade deste, como é descrito por Riul, A. Jr. et al [86]. Há uma vasta quantidade de materiais que podem ser utilizados como camada ativa, na literatura, estudos mostram a aplicação de ftalocianinas[87, 88], porfirinas[89, 90], nano partículas [91, 92] e polímeros condutores. [86, 93]

2.4.1 Método estatístico

A língua eletrônica (LE) é composta por uma quantidade n de sensores, sendo que cada um desses gera x valores de respostas elétricas (capacitância e/ou resistência) para uma dada amostra e sua respectiva repetição. Desta maneira, o arranjo de sensores que compõe a LE gera uma grande quantidade de dados que necessitam de ferramentas estatísticas específicas para serem manipulados. Essas ferramentas são conhecidas como ferramentas estatísticas de análise multivariada e são capazes de realizar análises simultâneas de duas ou mais variáveis. Entre as principais ferramentas estatísticas utilizadas em sistemas computacionais que realizam esse tipo de análise estão as redes neurais artificiais (RNA's) [79, 94], análise de componentes principais (PCA) [82, 95] e análise de clusters e lógica Fuzzy [96, 97]. Neste trabalho será utilizada a análise de componentes principais (PCA) para tratamento dos dados gerados pela LE.

2.4.1.1 Análise de componentes principais – PCA

A análise de componentes principais – PCA do inglês *Principal Component Analysis* é um método estatístico usado para redução de dimensionalidade dos dados, sem perda de informação, ou seja, é responsável por reduzir a matriz composta pelos dados iniciais coletados, transformando estes em um conjunto de novos dados, obtidos através de combinações lineares, para que possam ser analisados em gráficos bi ou tridimensionais. O novo conjunto de dados possui somente as informações relevantes dos dados originais, são correlacionados e, dão origem a eixos

ortogonais que são denominados de componentes principais (PC) [98]. As componentes principais são organizados em ordem decrescente de variância, sendo que a PC1 contém maior quantidade de informação (maior variância) correlacionando os dados. A quantidade máxima de PC que pode ser obtido está relacionada com a quantidade de variáveis, ou seja, 6 variáveis darão origem a 6 PCs. [99] A variância de cada PC vai estar descrita no seu eixo referente, e para que se consiga ter uma boa discriminação dos dados é desejável se obter um valor de 80% ou mais, ao somar PC1 e PC2.[100, 101]

A PCA é uma ferramenta bastante utilizada no tratamento dos dados obtidos pela LE, uma vez que consegue traduzir a grande quantidade de dados gerados em gráficos bidimensionais e tridimensionais facilitando o entendimento da resposta desta. Neste caso, a matriz de correlação dos dados será gerada utilizando-se os valores de resistência e/ou capacitância obtidos na análise. As linhas da matriz inicial serão dadas pelos valores de resistência obtida para as diferentes amostras e, a coluna, pelas unidades sensoriais. As semelhanças entre as amostras são observadas através do quanto elas se encontram próximas no gráfico e, a não semelhança, o quanto elas se encontram afastadas

3 OBJETIVO

Este trabalho tem como principal objetivo a obtenção de fibras poliméricas (de dimensões nanométricas e micrométricas) pela técnica de eletrofiação para aplicação como camada ativa em eletrodos interdigitados aplicados em sensores do tipo Língua Eletrônica. Estes sensores foram empregados para avaliação da qualidade de leite em relação à contaminação com o antibiótico tetraciclina, bem como em relação ao teor de gordura do leite.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi dividida em duas etapas apresentadas na Figura 4.1.

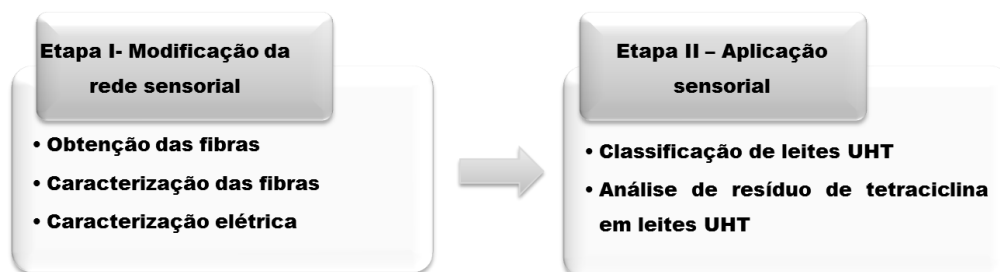


Figura 4.1 Fluxograma referente as etapas de execução do trabalho de dissertação.

A Etapa I está relacionada com a obtenção e caracterização das nanofibras de PA6 e de PA6/PAni. Para isso, primeiramente, foi avaliado o efeito da concentração de soluções do polímero PA6 sobre as propriedades morfológicas das fibras. Após a determinação da concentração do PA6 foram incorporadas diferentes concentrações de PAni em relação à massa de PA6 (% m/m): 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 %. As fibras de PA6 e PA6/PAni obtidas foram caracterizadas por diversas técnicas (item 4.1.4). Além disso, nessa etapa também foram obtidos os sensores interdigitados modificados através da deposição de nanofibras de PA6 e PA6/PAni em sua superfície. Após a deposição, essas unidades sensoriais foram caracterizadas por meio de espectroscopia de impedância.

Na Etapa II, os sensores obtidos foram empregados no sistema língua eletrônica, usando o conceito de seletividade global, para análise de leites comerciais com diferentes teores de gordura, diferentes marcas e contendo ou não resíduos de tetraciclina.

4.1 Etapa I

4.1.1 Materiais

Os reagentes tetraciclina (TC), Polianilina - PAni ($M_w = 20.000 \text{ g mol}^{-1}$), Poliamida 6 e 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich.

4.1.2 Soluções poliméricas para obtenção das fibras

Inicialmente, foram preparadas soluções com diferentes concentrações de PA6 em relação ao volume do solvente HFIP (% m/v), para definir a melhor concentração de PA6 para a obtenção das fibras. As concentrações de PA6 inicialmente utilizadas foram de 5, 10, 15, 20 e 25 % (m/v). As outras condições empregadas durante a eletrofição foram distância agulha-coletor de 5 cm, e diâmetro da agulha de 0,8 mm. Em seguida, para a obtenção das blendas poliméricas de PA6/PAni, foram preparadas seis soluções mantendo-se a concentração de PA6 em solução de 5% (m/v) e variando-se a porcentagem de PAni em relação à massa de PA6 (% m/m), como ilustrado na Tabela 4.1 Inicialmente, a PA6 foi solubilizada em HFIP sob agitação magnética por 2 horas e, posteriormente, foi acrescentada a PAni nesta solução. A solução obtida foi mantida sob agitação magnética por 3 horas, e, posteriormente por mais 30 minutos em banho ultrasônico. Para eletrofição da blenda PA6/PAni foram usados os mesmos parâmetros empregados para obtenção das fibras puras de PA6.

Tabela 4.1 Soluções poliméricas eletrofiadas.

Soluções	Concentração de PAni em relação à massa de PA6 (%m/m)
Solução 1	0
Solução 2	0,25
Solução 3	0,5
Solução 4	1
Solução 5	2,5
Solução 6	5

4.1.3 Eletrofição

O aparato experimental utilizado para a obtenção das nanofibras (Figura 4.2) consiste em uma fonte de alta tensão, um sistema de injeção da solução polimérica (bomba de injeção e seringa) e um sistema de coleta das fibras, composto por um coletor rotacional. A fonte de alta tensão utilizada é

da marca Glassman Hight Voltage modelo PS/FC60P02.0-22. O sistema de injeção da solução polimérica é constituído por uma bomba injetora KVS, modelo 100, na qual se acoplou uma seringa de vidro de 5 mL com um capilar resistente a solventes orgânicos (Fluran HCA F-5500-A, Ismatec) e uma agulha com diâmetro de 0,8 mm. O sistema de coleta das fibras é composto por um cilindro oco de alumínio acoplado a um motor conectado a um sistema de controle rotacional. O contato elétrico entre a fonte de alta tensão e a agulha é feito por meio de fios de cobre. Todo o aparato experimental encontra-se dentro de uma caixa acrílica que possui um sistema de segurança que desliga o sistema ao abrir a porta com a alta tensão ligada.

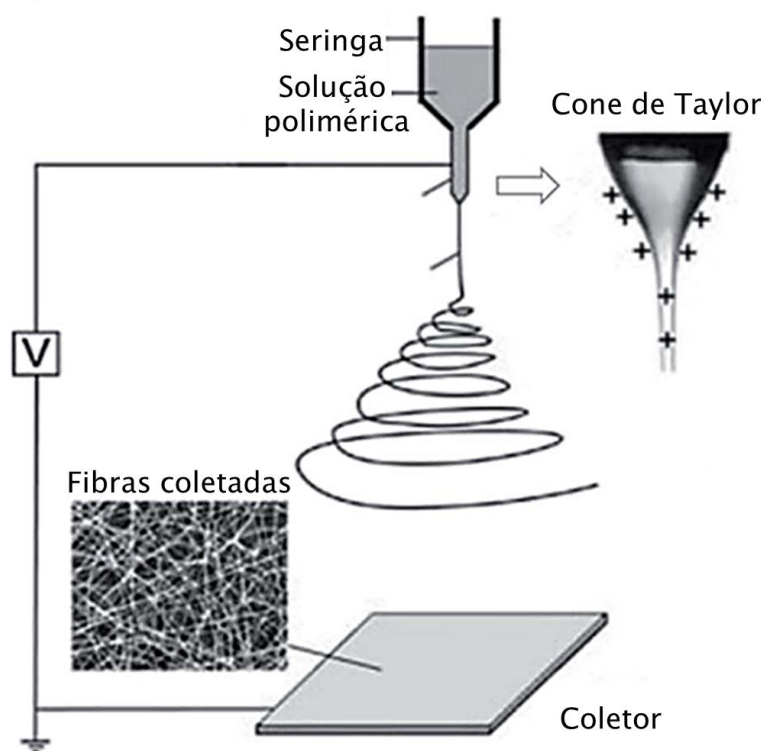


Figura 4.2 Esquema do aparato experimental da eletrofiação e em destaque o Cone de Taylor. Imagem retirada de Ke, P. et al, 2014. [102]

Para a deposição das fibras nos eletrodos interdigitados, estes foram colados (com fita carbono) sobre uma folha de alumínio utilizada para recobrir o coletor (Figura 4.3). A deposição das fibras nos eletrodos foi realizada por 45 segundos e, nas seguintes condições experimentais: tensão de 16 kV, taxa de ejeção de $0,01 \text{ mL h}^{-1}$ e distância de trabalho de 5 cm.

O tempo de deposição das fibras sobre os eletrodos foi definido experimentalmente por meio da análise de micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), dos eletrodos interdigitados com diferentes tempos de deposição de fibras (30, 45, 60, 300 e 600 segundos), como também pela caracterização elétrica (medida de resistência) deste em água destilada utilizando um analisador de impedância (SOLARTRON SI1260) e o software Zplot2.6 e Zview2.6.

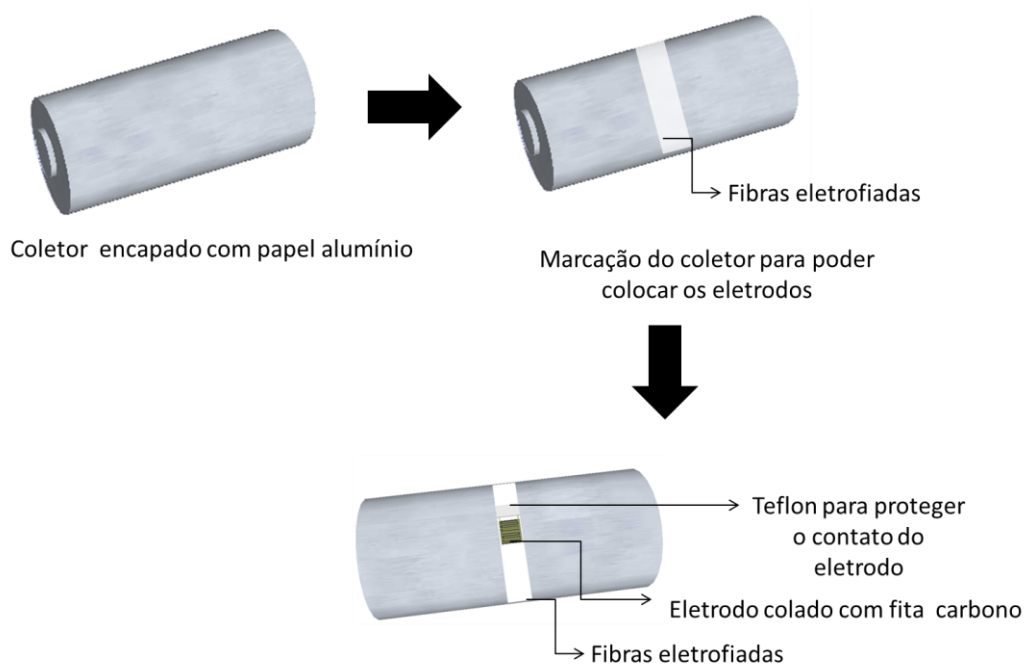


Figura 4.3 Preparação do eletrodo para eletrofição.

4.1.4 Caracterização das nanofibras de PA6 e PA6/PAni

a) *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A morfologia das fibras de PA6 e das blendas PA6/PAni foi analisada utilizando um microscópio eletrônico modelo JEOL 6510. Para o recobrimento da superfície das amostras com ouro foi utilizada uma metalizadora Leica EM SCD050. O diâmetro médio das fibras foi determinado através das imagens de MEV utilizando o *software* de análise de imagens *Image J*, da National Institutes of Health, USA. Para cada amostra, o diâmetro médio e sua distribuição foram determinados a partir da análise de 100 fibras aleatórias.

As micrografias foram obtidas nas tensões de 10 e 15 kV, onde foram obtidas micrografias com melhor resolução.

- Determinação do tempo de deposição das nanofibras sobre os eletrodos

O tempo de deposição das nanofibras sobre os eletrodos foi determinado por meio da análise de micrografias de MEV e pela caracterização elétrica. Para o MEV foram depositadas fibras de PA6 5% sobre os eletrodos em diferentes tempos (30, 45, 60, 300 e 600 segundos). Posteriormente, os eletrodos foram recobertos com ouro utilizando uma metalizadora Leica EM SCD050 e as micrografias foram obtidas por meio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo JEOL 6510.

b) Difração de Raios-X (DRX)

Padrões de difração de raios-X das mantas de fibras de PA6 e PA6/PAni foram obtidos usando um Difrátômetro Shimadzu XRD-6000 com varredura entre 5° e 35° (2θ) a uma velocidade de 1° por minuto. Para a realização desta análise, foram destacados pedaços (do tamanho do porta amostra) da manta de nanofibras poliméricas de PA6, Pa6/PAni, que foram colocadas sobre o porta amostra do equipamento. Para a amostra de PAni, colocou-se uma quantidade de pó desta sobre o porta amostra.

c) Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia RAMAN

Os espectros de infravermelho das fibras foram obtidos por meio do espectrômetro FTIR Vertex 70 (Bruker) com módulo ATR operando em modo de refletância, na região espectral de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução espectral de 2 cm^{-1} .

Os espectros de RAMAN foram obtidos por meio do espectrômetro RAMAN II (Bruker), laser YAG 1064nm com detector de germânio (resfriado com N_2 líquido). Foram feitos 128 scans na potência de 50 mV.

Uma pequena quantidade das nanofibras de PA6 e PA6/PAni foram destacadas da folha de alumínio e colocadas no módulo ATR, no caso do FTIR, e no porta amostra do RAMAN para que as medidas fossem realizadas. No caso da PAni, foi colocado o pó da amostra.

d) Análise Térmica

Os experimentos de termogravimetria (TGA) foram realizados em um equipamento Q500 da TA Instruments em atmosfera de nitrogênio com um fluxo de 60 mL min⁻¹. As amostras foram aquecidas a partir da temperatura ambiente até 700 °C. As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram efetuadas utilizando o equipamento Q100 TA Instruments em atmosfera de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) em duas corridas. Para ambos os ensaios utilizou-se uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e uma massa de aproximadamente 3 mg de amostra, sendo utilizado porta amostra de alumínio para o experimento de DSC e um porta amostra de platina para os experimentos de TGA.

4.1.5 Espectroscopia de impedância

A caracterização elétrica dos eletrodos, com diferentes tempos de deposição de nanofibras de PA6 e dos eletrodos modificados com as nanofibras de PA6/PAni, foi realizada utilizando-se um analisador de impedância (SOLARTRON SI1260) e o software Zplot2.6 e Zview2.6. Foram feitas varreduras de frequência no intervalo de 1 a 10⁶ Hz utilizando uma tensão elétrica (AC) de 200 mV. Essas medidas foram realizadas em água destilada.

Antes da inicialização da medida, cada sensor ficou imerso por 10 minutos em água destilada (tempo de estabilização), e posteriormente iniciou-se a medida elétrica. O tempo de estabilização foi investigado anteriormente pelo grupo de pesquisa, mostrando que a resposta elétrica do sensor se tornava estável após ficar imersa na amostra por 10 minutos. Já a escolha pela água destilada deve-se ao fato desta tender a ser mais estável do que a água deionizada, conforme observado experimentalmente em laboratório.

4.2 Etapa II

4.2.1 Amostras de leite puro e contaminadas com tetraciclina

Para a determinação de tetraciclina em matriz de leite foram utilizados leites UHT com diferentes teores de gordura (desnatado, semidesnatado e integral) de quatro marcas, totalizando 12 amostras. As marcas analisadas

foram selecionadas de acordo com os dados sobre maior consumo por região apresentado pela Revista Abastecimento (nov/dez 2012) [103]. Para preparo das soluções de leite que seriam contaminadas, diluiu-se 25 µL de leite em 100 mL de água destilada. A diluição das amostras de leite foi realizada de maneira a minimizar a contaminação das fibras e, conseqüentemente, das unidades sensoriais.

Foram preparadas soluções de cada tipo de leite (integral, semidesnatado e desnatado) com diferentes concentrações de tetraciclina (5, 25, 50, 100, 200 e 300 ppb), que foram utilizadas como padrão. Somente um leite de cada tipo (D_4 = desnatado, S_4 = semidesnatado, I_4 = integral) foi utilizado na análise. As concentrações de tetraciclinas nas amostras foram escolhidas de acordo com os valores estabelecidos pelos órgãos fiscais, tanto brasileiros como estrangeiros e, abaixo dos valores já detectados por outros processos de análise que visam avaliar a qualidade de leite. Foi preparada uma solução estoque de leite com concentração de tetraciclina de $1 \mu\text{L.mL}^{-1}$, obtendo-se por meio de sua diluição as soluções de leite com as diferentes concentrações de tetraciclina (Figura 4.4), que foram preparadas no momento da análise.

Para preparo das soluções de leite que seriam contaminadas, diluiu-se 25µL de leite em 100mL de água destilada. Na Tabela 4.II observa-se a classificação dos leites segundo o seu tipo e a quantidade de amostras usadas, já na Tabela 4.III são apresentadas as informações nutricionais de cada amostra, fornecidas pelos fabricantes.

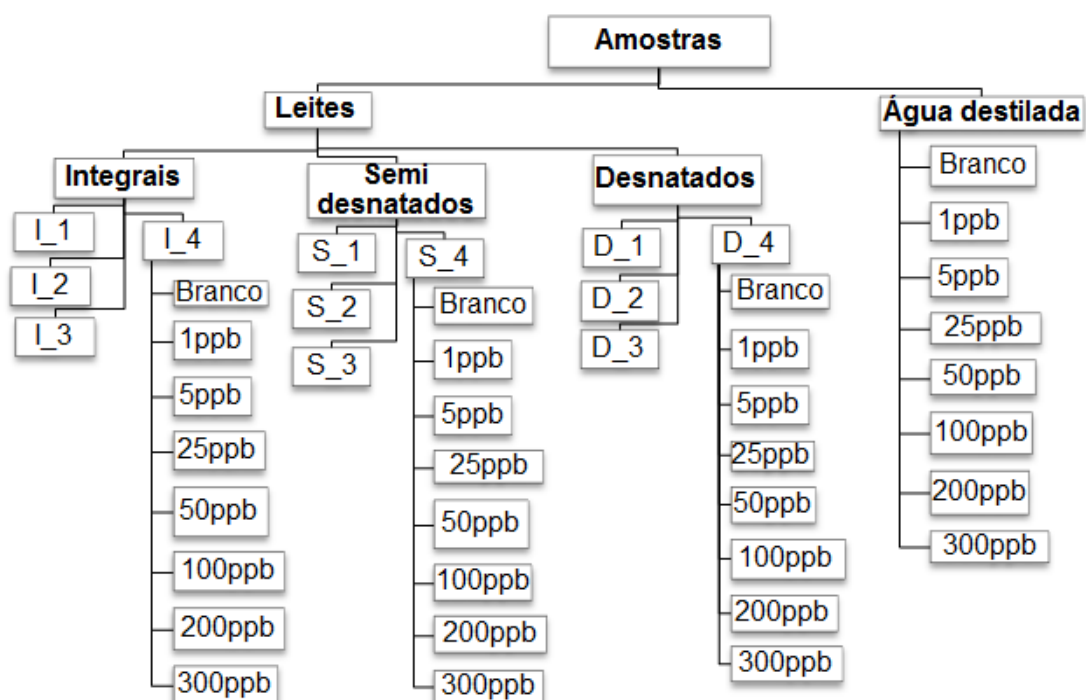


Figura 4.4 Organograma das amostras de leite analisadas.

Nesta figura, R_x representa as amostras, onde R é igual ao tipo de leite (R= I (integral), S (semidesnatado) e D (desnatado)) e x representa o número da amostra.

Tabela 4.II Classificação dos leites UHT segundo teor de gordura.

Classe	Teor de gordura (%)	Quantidade de leites
Integral UHT	≥ 3	4
Semidesnatado UHT	$3 < x \leq 0,6$	4
Desnatado UHT	$\leq 0,5$	4
	Total de amostras	12

Tabela 4.III Informações nutricionais dos leites empregados.

	Marca 1			Marca 2		
	I	S	D	I	S	D
Carboidratos:	10g	10g	10g	9,3g	9,4g	9,4g
Proteínas:	6,0g	6,0g	6,0g	6,2g	6,3g	6,3g
Gorduras totais:	6,0g	2,0g	1,0g	6,0g	2,0g	0
Gorduras saturadas:	4,0g	1,3g	0,6g	3,7g	1,2g	0
Sódio:	130mg	130mg	130mg	143mg	143mg	143mg
Cálcio:	240mg	240mg	240mg			
	Marca 3			Marca 4		
	I	S	D	I	S	D
Carboidratos:	9,6g	9,8g	10g	10g	10g	10g
Proteínas:	6g	6g	6g	5,8g	5,8g	5,8g
Gorduras totais:	6,4g	2,2g	0,7g	6,0g	1,2g	1g
Gorduras saturadas:	4,2g	1,4g	0,5g	4,0g	0	0
Sódio:	130mg	132mg	133mg	105mg	115mg	125mg
Cálcio:	234mg	238mg	240mg	240mg	250mg	260mg

*Dados fornecidos nas embalagens de leites utilizados, que foram fornecidos pelos fabricantes.

4.2.2 Análise utilizando o sistema Língua Eletrônica

O sistema de aquisição de dados é formado por um arranjo de unidades sensoriais (língua eletrônica) conectadas a um multiplexador de 6 canais (que permite a aquisição dos dados de todos os sensores sequencialmente) produzido pela própria Embrapa Instrumentação, acoplado a um analisador de impedância (SOLARTRON SI1260).

As unidades sensoriais que compõe a língua eletrônica foram obtidas por meio da modificação de eletrodos interdigitados de ouro com as

nanofibras eletrofiadas. Esta modificação foi feita eletrofiando-se as soluções poliméricas diretamente sob os eletrodos por um período de 45 segundos.

Eletrodos de ouro contendo 50 pares de trilhas foram fabricados sobre lâminas de vidro ótico BK7 (Figura 4.5) por fotolitografia, que foram doados pelo Prof. Dr. Fernando Josepetti Fonseca, da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (POLI-USP). As dimensões físicas deste estão descritas na Tabela 4.IV.

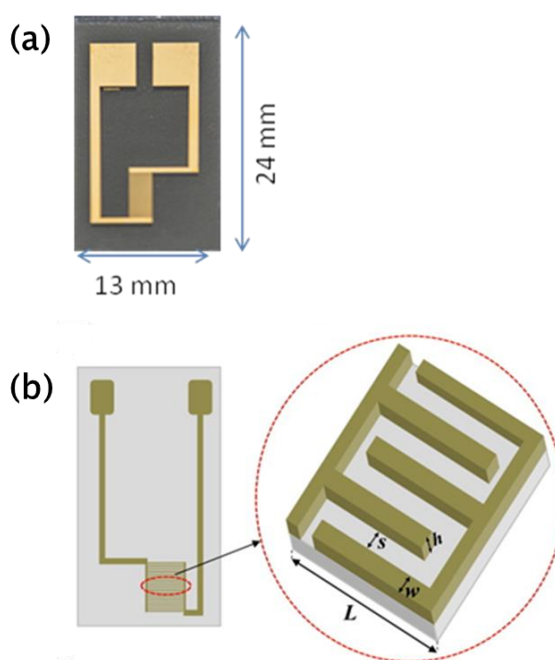


Figura 4.5 (a) Foto do eletrodo interdigitado . (b) Figura esquemática dos IMEs de ouro, mostrando suas principais características geométricas. Imagem (b) retirada de Manzoli, A. et al,2014. [104]

Tabela 4.IV Dimensões dos eletrodo interdigitado mostrado da Figura 4.5

	Eletrodo de Ouro
Quantidade de dígitos	50
Largura dos dígitos (w)	10 μm
Comprimento dos dígitos (l)	5 mm
Espaço entre os dígitos (s)	10 μm
Altura dos dígitos (h)	0,20 μm

Para as análises de leites realizadas neste trabalho foi utilizado um arranjo de 7 unidades sensoriais que diferem-se entre si quanto à porcentagem de PAni nas fibras de PA6/PAni, e que estão descritos abaixo:

Sensor 1: IME sem camada ativa

Sensor 2: IME PA6

Sensor 3: IME PA 6 + 0,25%PAni

Sensor 4: IME PA6 + 0,5%PAni

Sensor 5: IME PA 6 + 1%PAni

Sensor 6: IME PA 6 + 2,5%PAni

Sensor 7: IME PA6 + 5 %PAni

As medidas e a obtenção dos dados de capacitância e resistência elétrica foram feitos com o programa SLE2F, desenvolvido em plataforma LabView na EMBRAPA Instrumentação, o qual é utilizado com o analisador de impedância e um multiplexador. Os dados de capacitância e de resistência foram obtidos na frequência de 1 kHz, sendo realizadas 3 repetições (triplicata) de 5 medidas por eletrodo. Os experimentos foram realizados em 4 dias consecutivos, descritos na Tabela 4.V.

As medidas de resistência e capacitância elétrica foram realizadas na frequência de 1 kHz. Nesta região frequencial (intermediária) a impedância é dominada por efeitos da condutância da solução, bem como pela composição da camada ativa (no nosso caso, nanofibras condutoras). Em contrapartida, em regiões de baixa frequência a resposta da impedância é dominada por efeitos da dupla-camada elétrica, formada pela interface eletrólito/eletrodo. Já em regiões de alta frequência, a resposta tende a ser dominada pelas características geométricas do eletrodo. [75, 105]

Tabela 4.V Experimentos com leites contaminados com tetraciclina.

Dia	Amostras
1°	Água destilada, águas contaminadas e D_1, D_2, D_3, S_1, S_2, S_3, I_1, I_2 e I_3
2°	D_4, D_1ppb, D_5ppb, D_25ppb, D_50ppb, D_100ppb, D_200ppb e D_300ppb
3°	S_4, S_1ppb, S_5ppb, S_25ppb, S_50ppb, S_100ppb, S_200ppb e S_300ppb
4°	I_4, I_1ppb, I_5ppb, I_25ppb, I_50ppb, I_100ppb, I_200ppb e I_300ppb

As medidas elétricas foram feitas nas soluções em ordem crescente de concentração de tetraciclina e teor de gordura (no caso das amostras de leite não contaminado), visando diminuir possíveis efeitos de saturação ou "envenenamento" das unidades sensoriais durante as medidas.

4.2.3 Análise estatística dos resultados obtidos

Os dados experimentais foram tratados e analisados pela técnica de Análise de Componentes Principais (PCA), que reduz a dimensionalidade dos dados (sem perda de informação), auxiliando no reconhecimento, classificação, e na verificação de correlação entre as amostras. A PCA foi feita a partir dos valores de resistência obtidos na frequência de 1 kHz, utilizando o software *Statistica*, versão 7.

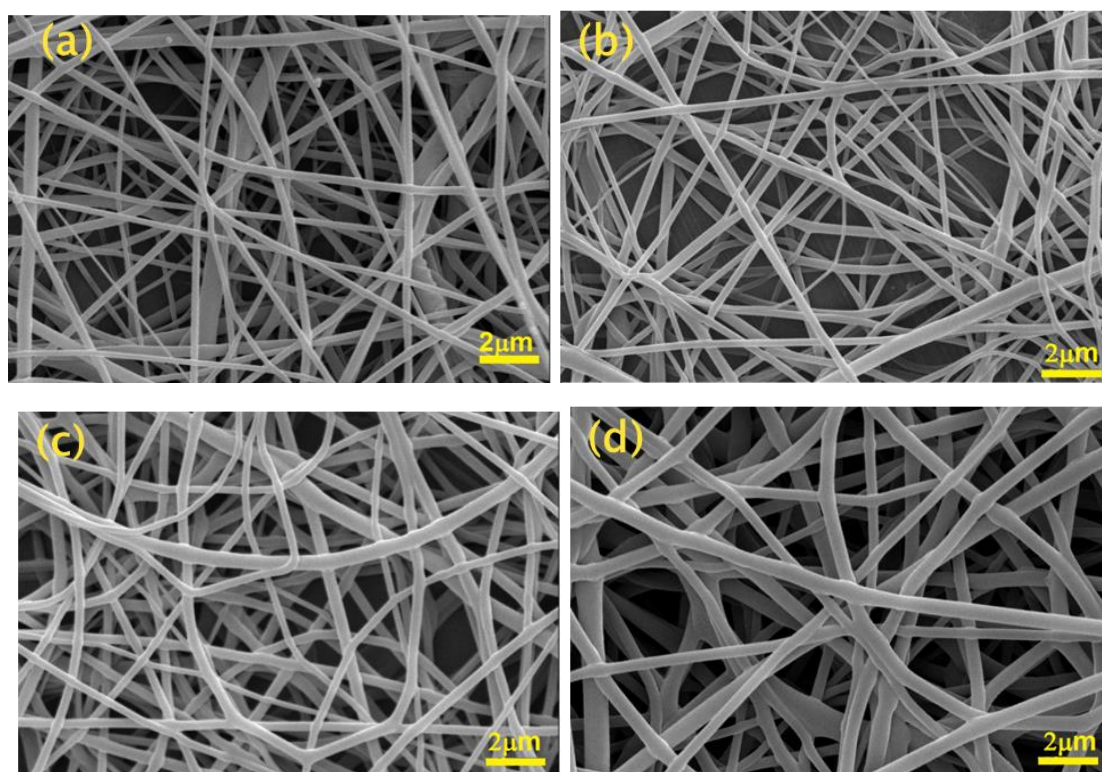
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa I

5.1.1 Caracterização morfológica das fibras

5.1.1.1 Efeito da concentração de PA6

As micrografias de MEV das nanofibras de PA6 obtidas a partir de diferentes concentrações do polímero estão apresentadas na Figura 5.1. Para obtenção das imagens, as mantas foram eletrofiadas sobre uma folha de papel alumínio por aproximadamente 15 minutos. Analisando as imagens é possível verificar que, para todas as concentrações de PA6, as fibras apresentam morfologia homogênea, sem porosidade e sem defeitos superficiais.



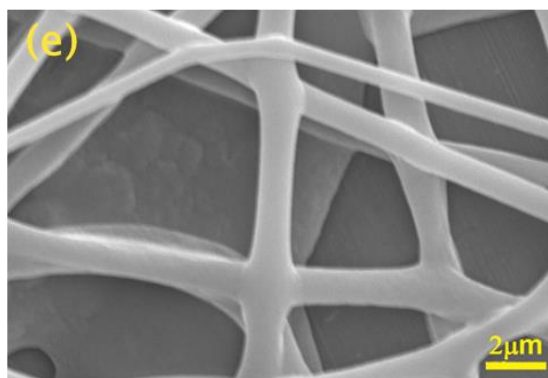


Figura 5.1 Micrografias das fibras com variação da concentração de PA6 (% m/m): (a) 5%; (b) 10%; (c) 15%; (d) 20% e (e) 25%.

Através das micrografias de MEV foi possível calcular o diâmetro médio das nanofibras, conforme ilustrado na Tabela 5.1. Pode-se verificar que, de forma geral, ocorre um aumento do diâmetro das fibras com o aumento da concentração do polímero. Este comportamento ocorre pelo aumento na viscosidade da solução (para a solução de maior concentração), decorrente do maior emaranhado de cadeias poliméricas, e que, conseqüentemente, leva a um aumento no diâmetro das fibras [59]. A dispersão dos diâmetros das fibras observada na Figura 5.1 pode ser explicada pela variação na estabilidade do jato ao longo de seu estiramento, ocasionada por desequilíbrio da tensão superficial e das forças elétricas. [59] Com base nas imagens e nos valores de diâmetro apresentados na Tabela 5.1 pode-se verificar que as fibras obtidas a partir da eletrofiação da solução contendo 5% (m/v) de PA6 possuem o menor diâmetro médio. Como fibras de pequenos diâmetros são mais adequadas para aplicações em sensores (devido á maior relação área superficial/volume), optou-se por usar a solução mais diluída (5% de PA6) para preparo das soluções da blenda PA6/PAni.

Tabela 5.1 Influência da concentração de PA6 no diâmetro das fibras.

Amostras	Diâmetro das fibras (nm)
PA6- 5%	276 ± 74
PA6- 10%	298 ± 84
PA6- 15%	387 ± 78
PA6- 20%	503 ± 126
PA6- 25%	1533 ± 583

5.1.1.2 Blenda polimérica PA6/PAni

Após a determinação da concentração otimizada de PA6, nanofibras de PA6/PAni foram eletrofiadas, utilizando-se o mesmo aparato experimental descrito anteriormente. Variou-se a concentração mássica de PAni em relação a massa de PA6 (m/m), e a eletrofiação foi realizada por aproximadamente 15 minutos sobre uma folha de papel alumínio. As micrografias de MEV das nanofibras obtidas são apresentadas na Figura 5.2. Por meio das micrografias e da Tabela 5.II percebe-se que o aumento da concentração de PAni na blenda diminui o diâmetro das nanofibras formadas, sendo este comportamento bastante significativo para as concentrações de 0,25% e 0,5% de PAni (m/m). A adição da PAni aumenta a condutividade elétrica da solução, resultando numa maior mobilidade dos íons na solução. Este comportamento associado ao campo elétrico externo aplicado faz com que a gota polimérica seja alongada mais facilmente, se espalhando em segmentos mais finos e resultando em fibras mais homogêneas e com menores diâmetros. [60, 106-108]

Tabela 5.II Diâmetros das nanofibras PA6/PAni.

Composição das amostras	Diâmetro (nm)
PA6- 5%	276 ± 74
PA 5% + 0,25%PAni	242 ± 58
PA 5% + 0,5%PAni	154 ± 63
PA 5% + 1,0%PAni	145 ± 57
PA 5% + 2,5%PAni	141 ± 63
PA 5% + 5,0%PAni	137 ± 53

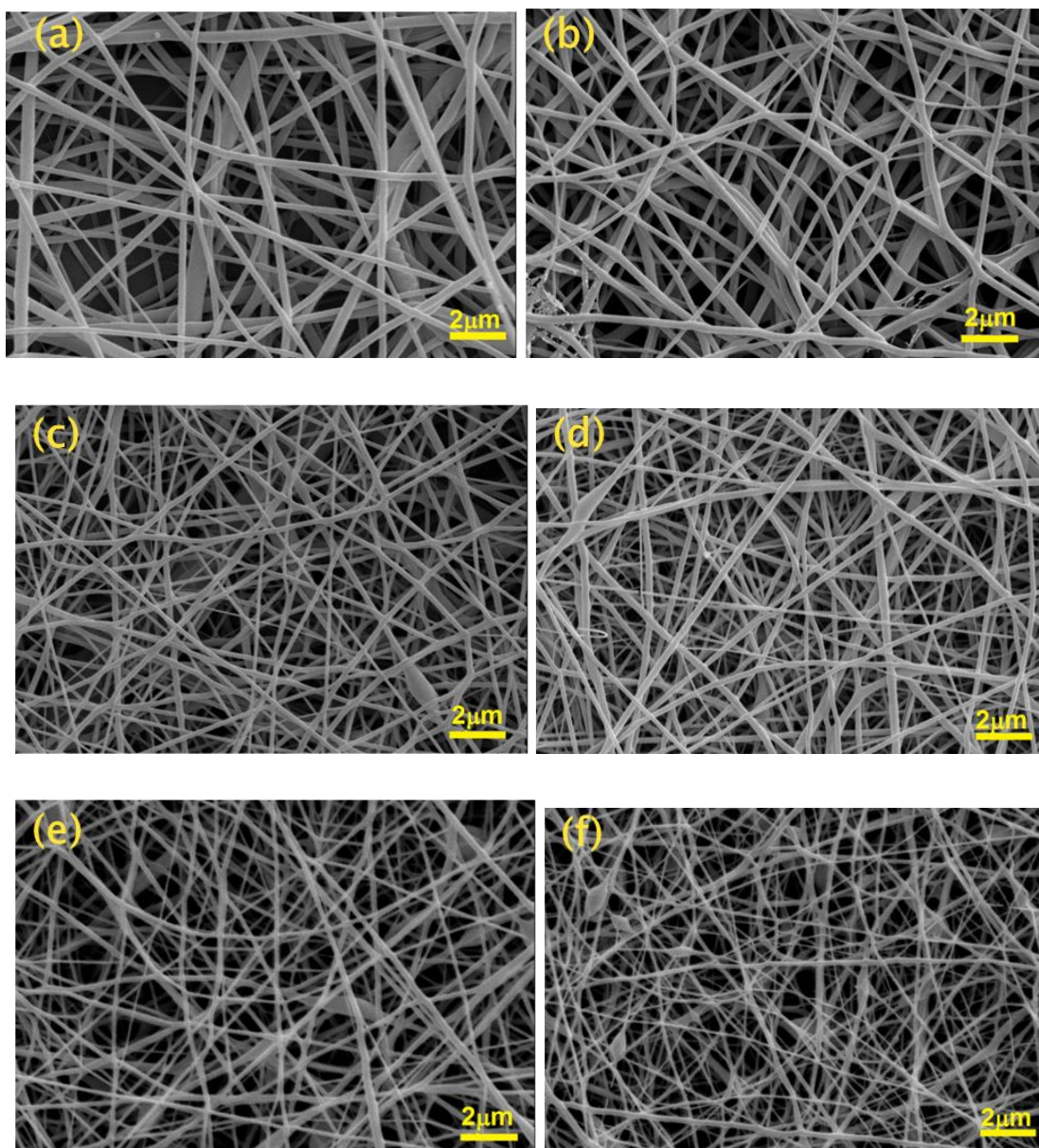


Figura 5.2 Micrografias das nanofibras da blenda polimérica de PA6/PAni com diferentes concentrações de PAni. (a) 0%; (b) 0,25%; (c) 0,5%; (d) 1%; (e) 2,5%; (f) 5%.

5.1.2 Caracterização espectroscópica

Os espectros de FTIR da polianilina base esmeraldina (EB) e das nanofibras de PA6 e PA6/PAni são ilustradas na Figura 5.3. Os números de onda e suas atribuições estão descritos na Tabela 5.III. Analisando-se os espectros, pode-se observar que não há presença de bandas vibracionais características da PAni nas nanofibras da blenda polimérica PA6/PAni, devido à baixa quantidade de PAni nas blendas (inferior ao detectável pelo equipamento).

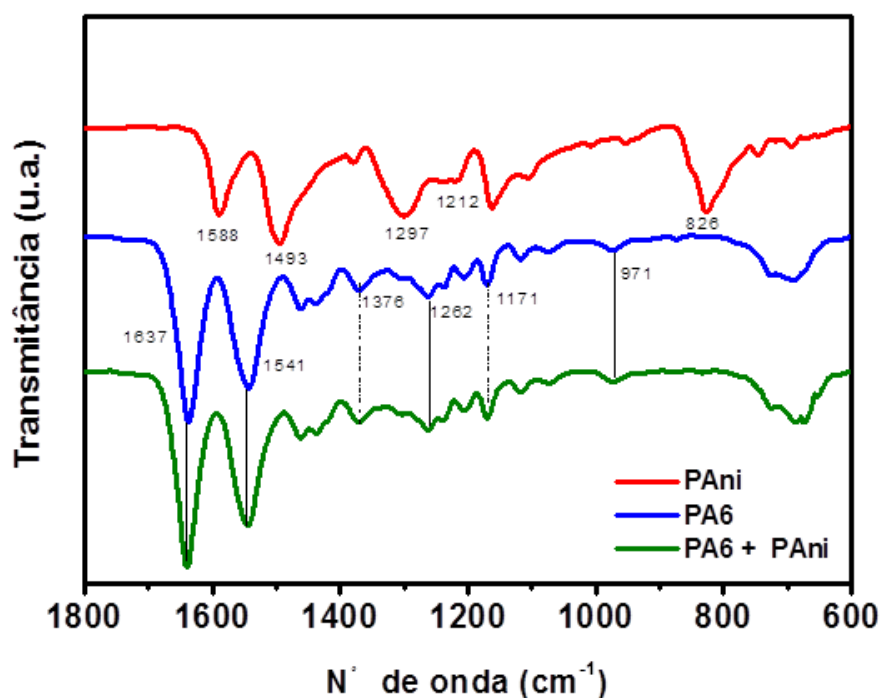


Figura 5.3 Espectros de FTIR das amostras PAni, PA6 e PA6/PAni.

Tabela 5.III Atribuição das bandas vibracionais observadas no espectro IR.

Amostra	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
PAni (EB)	1588	Elongações aromáticas C=C (Q) ¹
	1493	Elongações aromáticas C=C (B) ²
	1297	Aminas primárias das terminações da cadeia ³
	1212	Deformação axial C-N (B) ⁴
	826	Deformação fora do plano das ligações C-H dos ciclos aromáticos. ⁵
Fibras de PA6 e PA6/PAni	1637	Estiramento C=O da Amida I ⁶
	1541	δN-H da Amida II ⁷
	1376	Deformação angular Amida III +CH ₂ ⁸
	1262	Deformação angular Amida III +CH ₂ ⁹
	1171	C-O-NH ¹⁰
	971	CONH no plano (γ) ¹¹

* Notação: Q refere-se ao anel aromático quinóide e, B ao anel aromático benzóide, ambos da PAni.

** 1,2,4,5 [109, 110],³ [110],^{6,7} [111, 112] e ⁸⁻¹¹ [111].

Com o intuito de se complementar o estudo e confirmar a presença da PAni nas nanofibras, as mesmas amostras foram caracterizadas por espectroscopia Raman. Os espectros das fibras da blenda PA6/PAni são

apresentados na Figura 5.4 e as atribuições para as bandas são apresentadas na Tabela 5.IV. Os picos característicos em 1172, 1375, 1506 e 1602 cm^{-1} confirmam a presença de PANi nas fibras da blenda polimérica de PA6/PAni.

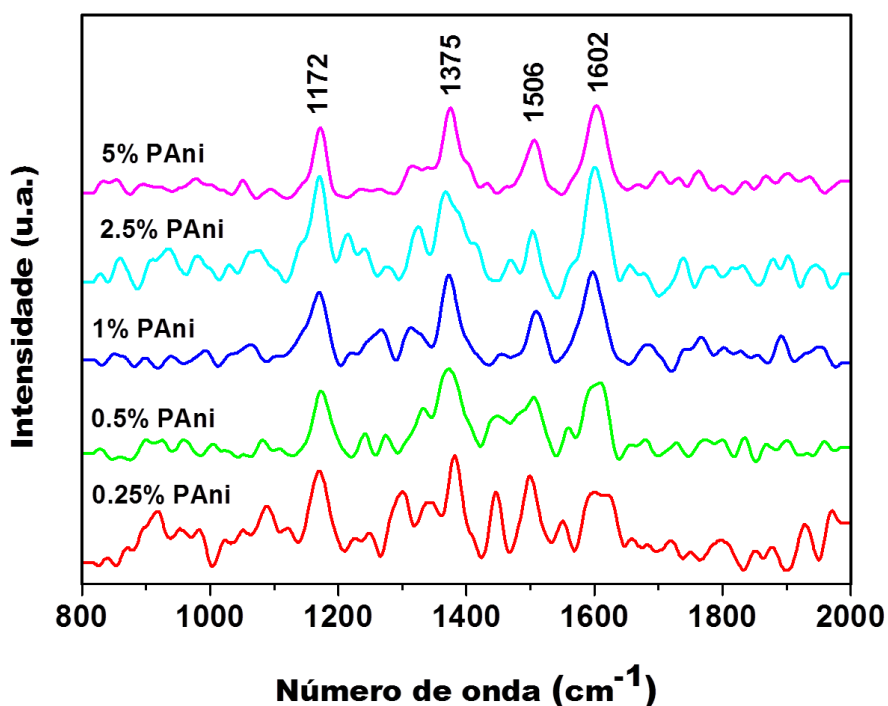


Figura 5.4 Espectro RAMAN das fibras das blends de PA6/PAni.

Tabela 5.IV Atribuição das bandas vibracionais observadas no espectro RAMAN

Número de onda (cm^{-1})	Atribuições
1172	$\beta\text{C-H (Q)}^1$
1375	Estiramento C=N ²
1506	Estiramento N-B-N ³
1602	Estiramento N-Q-N ⁴

* Notação: Q refere-se ao anel quinóide e, B ao anel benzóide, ambos da PANi.

** ¹[113-115], ²[116], ³[114], ⁴[116], ⁴[114, 116]

5.1.3 Difração de Raio X

A caracterização estrutural por DRX das nanofibras poliméricas de PA6 e da blenda PA6/PAni são ilustradas nos difratogramas da Figura 5.5. Alguns trabalhos [33, 108, 117-119] relatam que a poliamida 6 possui duas fases cristalinas características, a fase α (monoclínica, estável, conformação zigzag) e a fase γ (pseudo hexagonal, meta estável, conformação helicoidal).

Os picos cristalinos dessas fases correspondem a $2\theta = 20^\circ$ (200) e 24° (002) para fase α , e $2\theta = 21,5^\circ$ (001) pra a fase γ , respectivamente.

Na Figura 5.5 observamos que todas as amostras apresentaram as duas fases características da PA 6 com $2\theta = 19,9^\circ$ e $22,4^\circ$ para a fase α (α_1 e α_2) e, para fase γ obtivemos $2\theta = 21,3^\circ$. Pode-se verificar também que nenhuma modificação dessas estruturas foi observada decorrente da adição da PANi.

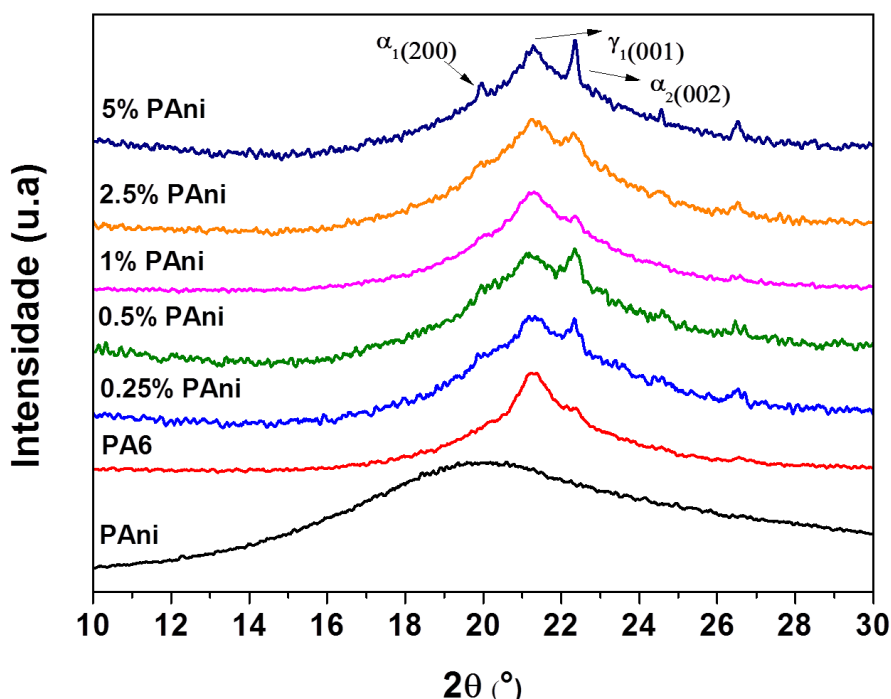


Figura 5.5 Difratomogramas das nanofibras de PA 6 e das blendas poliméricas de PA 6/PAni.

5.1.4 Análise térmica

A avaliação do comportamento térmico das nanofibras de PA6 e da blenda de PA6/PAni foi realizada por meio das técnicas de DSC e TGA. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 5.6 e 5.7 e, na Tabela 5.V.

Na Figura 5.6. nota-se que não houve variação significativa nas curvas de DSC nas nanofibras da blenda de PA6/PAni em relação as de PA6 pura. As curvas obtidas apresentam dois eventos endotérmicos (1 e 2). O primeiro evento (1), observado em torno de 204°C , é referente à fusão da fase γ e, o

segundo (2), em torno de 219 °C, refere-se à fusão dos cristais de fase α , que são mais estáveis, e assim possuem uma maior T_m (Temperatura de fusão) (Tabela 5.V.) do que os cristais de fase γ , que são metaestáveis. Na curva da amostra contendo 5% de PAni, além dos eventos 1 e 2, pode-se observar um outro processo também endotérmico (3) referente à fusão de resíduos das fases cristalinas características do PA6. [33, 108, 119] Pode-se verificar também na Tabela 5.V. que o valor de ΔH_m também não sofreu alteração em relação ao valor reportado na literatura para nanofibras de PA6 puro. [33, 120]. Na curva da amostra de PAni, nota-se um pequeno pico endotérmico entre as temperaturas de 55°C à 105°C, referente à evaporação de água estrutural [121, 122], não sendo observada transição referente à temperatura de fusão. Analisando os valores de $T_{m\alpha}$, $T_{m\gamma}$ e $\Delta H_{m\alpha}$, encontrados na Tabela 5.V. observa-se que a PAni não influenciou nas propriedades térmicas da PA6, porém nota-se que o incremento da porcentagem de PAni nas fibras leva à uma variação na quantidade das fase α , bastante nítido na amostra com 5% de PAni. Esse mesmo fato foi relatado em Silva, A.B. et al ,2012.[108]

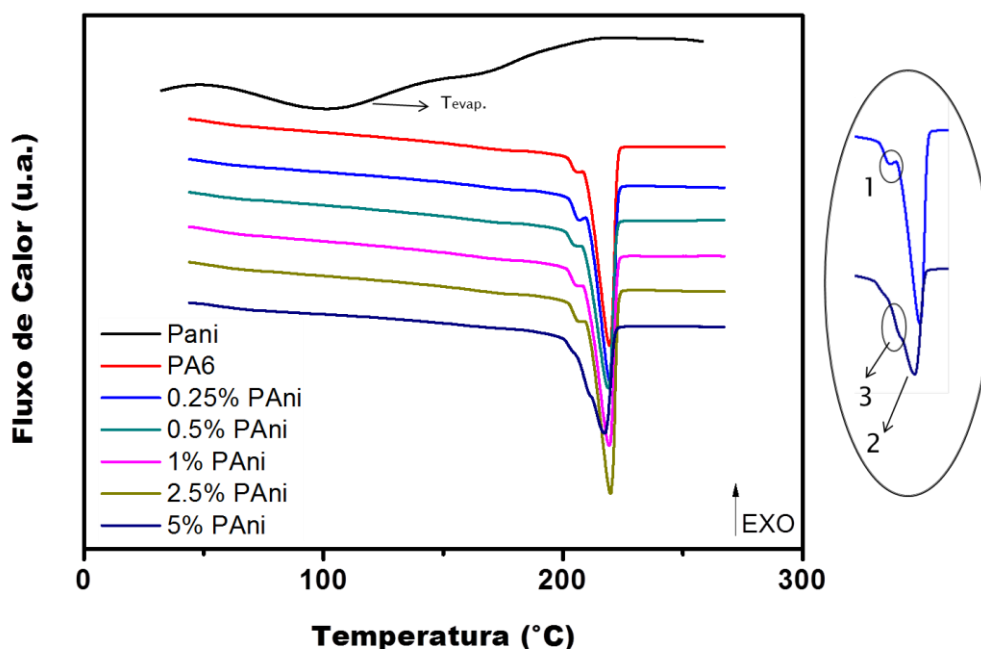


Figura 5.6 Curvas de DSC das amostras das fibras de PA6 e PA6/PAni. Em destaque é mostrado a diferença entre uma amostra com 0,25% de PAni e outra com 5% de PAni.

Tabela 5.V Valores das análises de DSC e TGA.

Amostra	T_{mα} (°C)	ΔH_{mα} (J/g)	T_{mγ} (°C)	T_i decomp. (°C)
PAni				400
PA6 5%	220	43	204	386
PA6 5% + 0,25% PAni	220	39	206	378
PA6 5% + 0,50% PAni	219	37	205	377
PA6 5% + 1,00% PAni	220	40	205	377
PA6 5% + 2,50% PAni	220	41	205	384
PA6 5% + 5,00% PAni	218	34	205	379

Na Figura 5.7 são ilustradas as curvas termogravimétricas onde é possível ver que não há diferença significativa na temperatura de decomposição das nanofibras de PA6/PAni em relação à de PA6, pois a variação observada está dentro da taxa de aquecimento estabelecida (10°/min). Assim, nota-se que a PAni, nas concentrações utilizadas neste trabalho, não alterou a estabilidade térmica da matriz de PA6. Na curva da PAni pura observa-se que a decomposição se inicia por volta de 400°C, característico deste material [108, 122, 123]

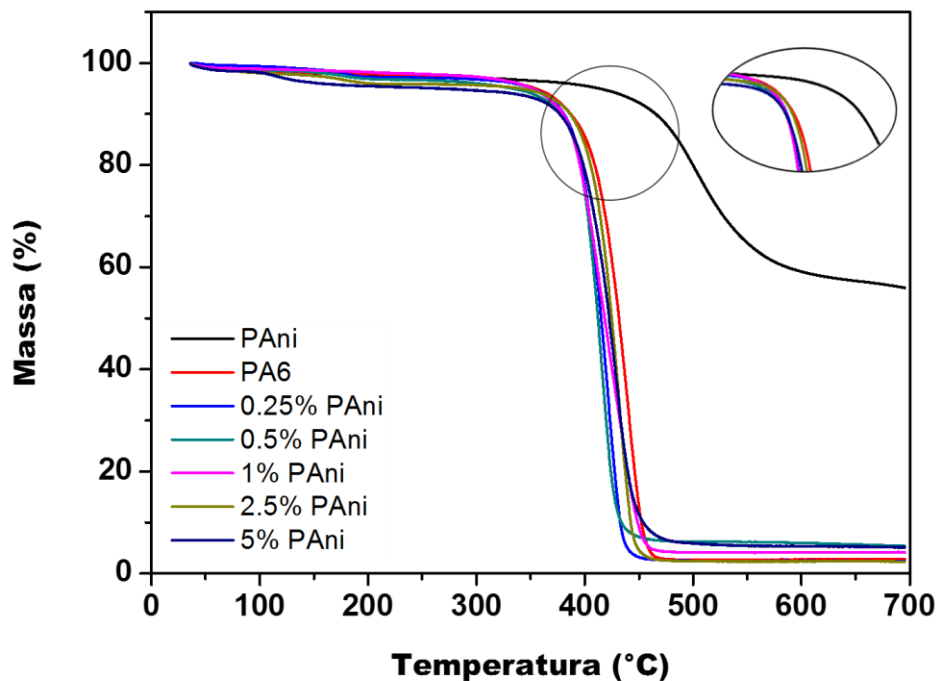


Figura 5.7 Curvas termogravimétricas das blends de PA6/PAni.

5.1.5 Determinação do tempo de deposição das fibras sobre os eletrodos

A fim de se verificar a influência da quantidade de fibra na resposta elétrica dos eletrodos, uma solução somente de PA6-5% (m/v) foi eletrofiada sobre eletrodos variando o tempo de fiação (deposição das fibras sobre o eletrodo). Após a modificação, estes foram caracterizados por espectroscopia de impedância utilizando como analito água destilada. As micrografias obtidas por MEV são apresentadas na Figura 5.8 e os gráficos de medida de resistência e capacitância em função da frequência destes eletrodos são apresentados na Figura 5.9.

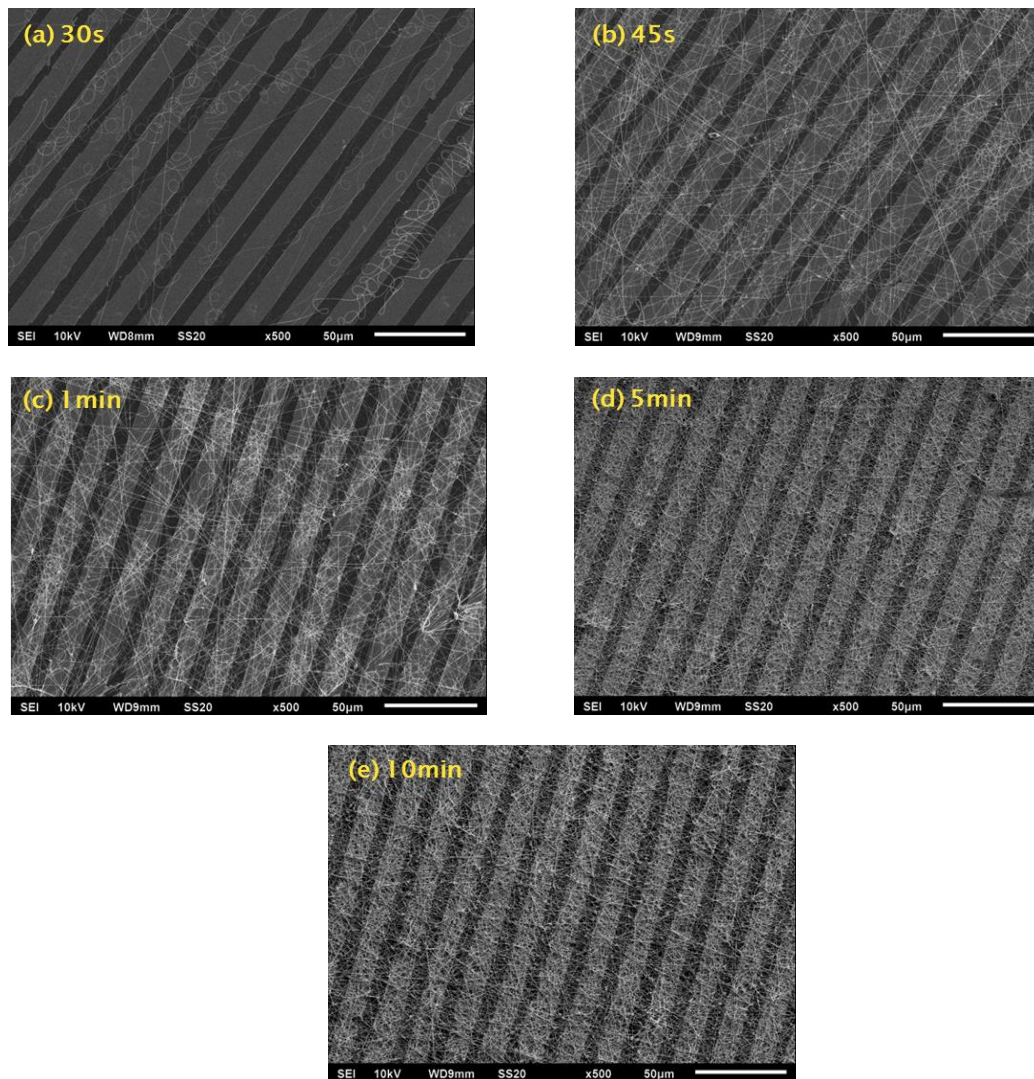


Figura 5.8 Micrografias dos eletrodos modificados com nanofibras em diferentes tempos. (a) 30 segundos; (b) 45 segundos; (c) 1 minuto; (d) 5 minutos e (e) 10 minutos.

A Figura 5.9 mostra que o eletrodo com deposição de fibras por 10 minutos apresenta uma maior resistência elétrica, a qual é decorrente da maior quantidade de fibras depositadas, o que pode diminuir a eficiência da interação ocorrida na interface eletrodo/solução. Este comportamento pode ser melhor visualizado na Figura 5.10, a qual ilustra uma visão lateral do eletrodo e a possível organização das fibras. Já os eletrodos preparados nos outros tempos de deposição apresentam diferença sutil de comportamento em todas as regiões frequenciais. Sendo o eletrodo com tempo de deposição de 10 minutos foi o único a apresentar uma mudança clara no comportamento elétrico na região de alta frequência, na qual a resposta tende a ser dominada pelas características geométricas do eletrodo.

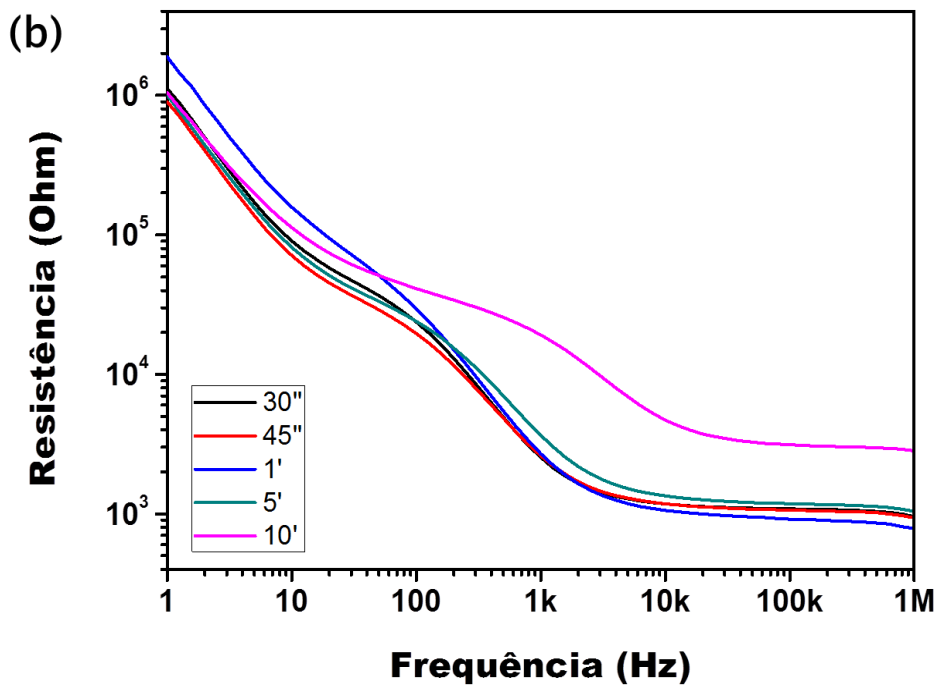
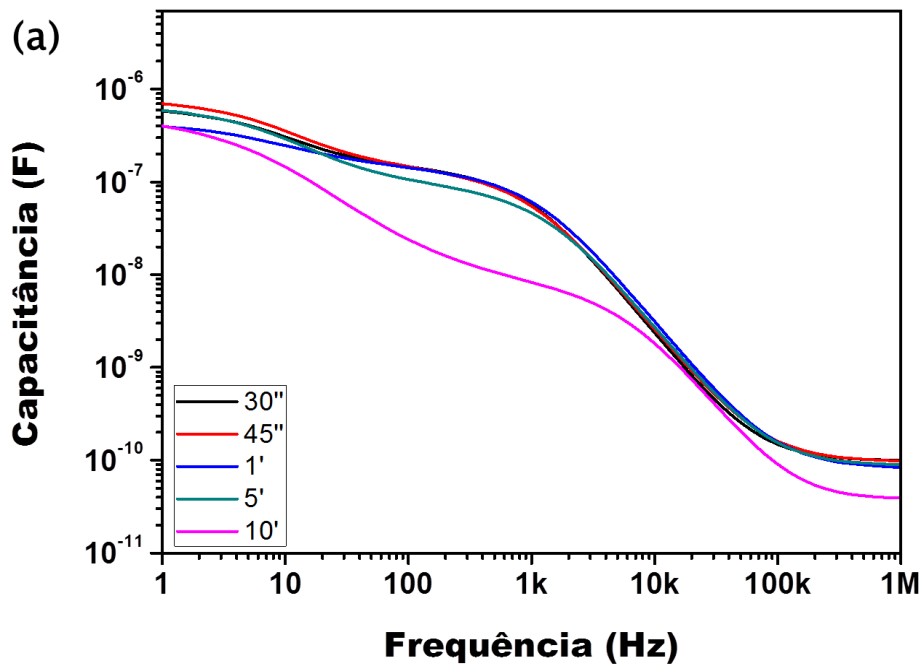


Figura 5.9 Gráfico do comportamento elétrico das unidades sensoriais em relação ao tempo de deposição das mantas de fibras de PA6. (a) Capacitância em função da frequência; (b) Resistência em função da frequência.

Assim, o tempo de deposição foi determinado baseado nas micrografias apresentadas na Figura 5.8, e nos valores de resistência e capacitância da Figura 5.9. Escolheu-se o tempo de 45 s para deposição das fibras devido à menor resistência elétrica apresentada pelo eletrodo (em comparação ao tempo de 10 minutos), e à obtenção de uma manta homogênea e com uma quantidade de fibras adequada. A quantidade de fibras depositada é um fator decisivo no desempenho do sensor, pois o mesmo não deve ter um caráter muito resistivo (que poderia ser causado por uma deposição excessiva de fibras), mas ao mesmo tempo deve apresentar uma elevada superfície de contato, se diferenciando (em termos de resposta elétrica) do eletrodo sem recobrimento.

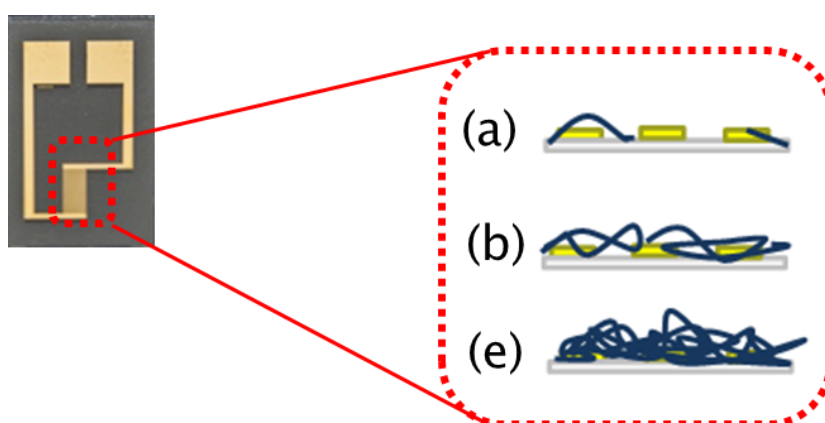


Figura 5.10 Esquema da visão lateral do eletrodo com fibras depositadas por (a) 30 s, (b) 45 s e (e) 10 min.

5.1.6 Caracterização elétrica

Para verificar a influência das fibras de PA6 puro e destas com diferentes porcentagens de PAni na resposta elétrica do eletrodo foram realizadas medidas de espectroscopia de impedância. Os gráficos de medida de resistência e capacitância em função da frequência destes eletrodos são apresentados na Figura 5.11. As curvas do eletrodo modificado apenas com fibras de PA6 não foram apresentadas.

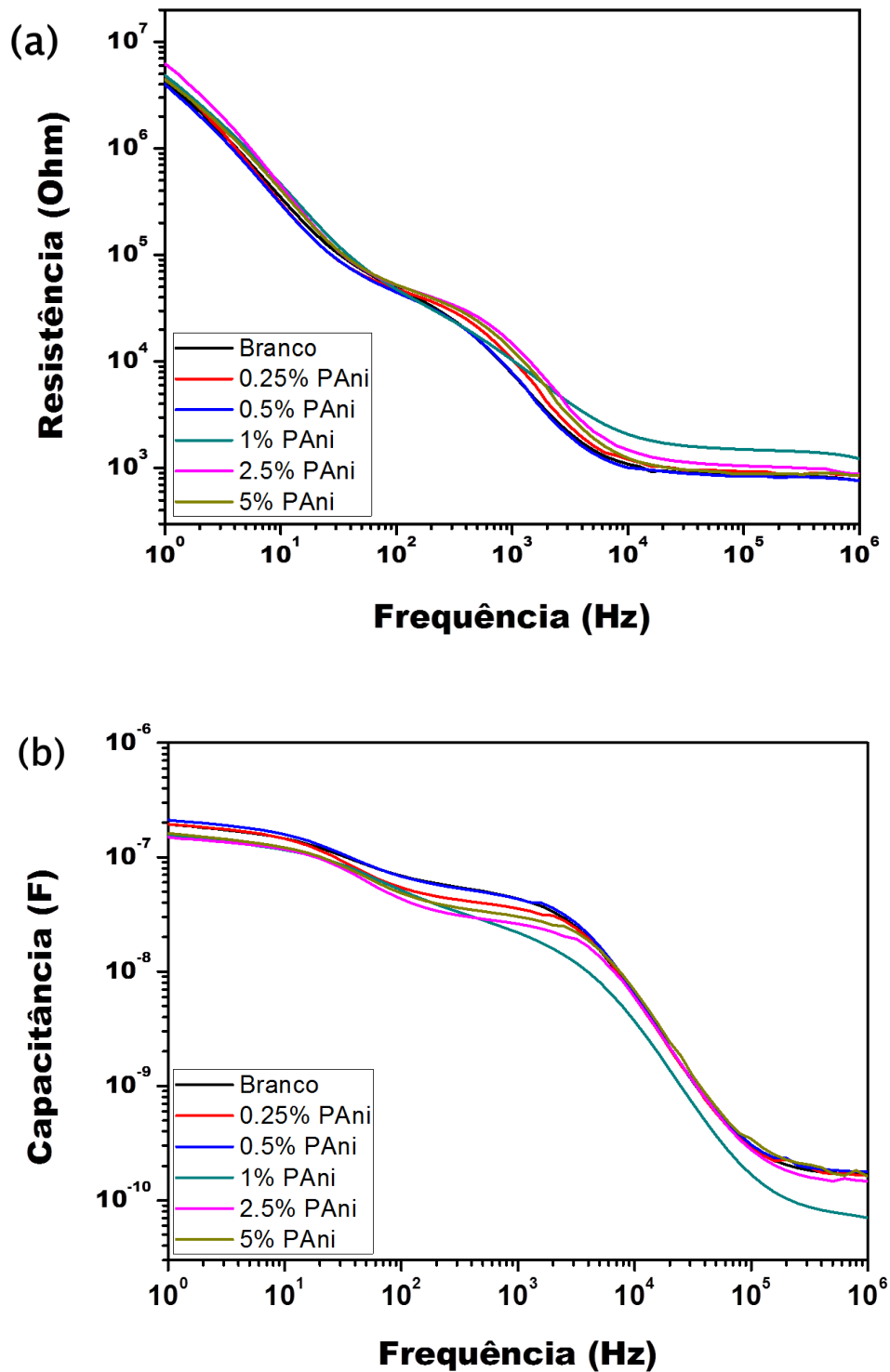


Figura 5. 11 Gráficos do comportamento elétrico das unidades sensoriais com nanofibras em água destilada: (a) Variação da resistência em função da frequência; (b) Variação da capacitância em função da frequência.

Por meio da Figura 5.11, pode-se observar que a adição de PANi nas fibras ocasionou uma mudança sutil na resposta elétrica dos sensores, principalmente na faixa espectral intermediária, onde a impedância é dominada por efeitos da condutância da solução, bem como pela composição da camada ativa (no nosso caso, nanofibras condutoras). [76, 105]

5.2 Etapa II

5.2.1 Medidas com a língua eletrônica e análise das componentes principais

5.2.1.1 Classificação das amostras segundo o teor de gordura.

Inicialmente, o arranjo sensorial desenvolvido neste trabalho foi empregado para a classificação de leites comerciais em relação à porcentagem de gordura. Para avaliar a capacidade desta língua eletrônica em distinguir leites comerciais com diferentes teores de gordura, foram analisados os seguintes tipos de leite: desnatado, semidesnatado e integral de 3 diferentes marcas, como ilustrado na Figura 5.12.

Os dados de variância apresentados no gráfico PCA foram obtidos com as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), que correspondem a 94,26% de toda a informação coletada pela LE. Os dados também mostraram que o conjunto de sensores empregado obteve uma boa discriminação entre os tipos de leite (integrais, semidesnatados e desnatados), demonstrando uma forte correlação entre o eixo PC1 (87,35%) e os diferentes tipos de leite. A separação por tipos de leite foi em relação ao teor de gordura de cada tipo, uma vez que a composição nutricional (Tabela 4.III) fornecida pelos fabricantes mostrou que não há diferença significativa entre outros componentes, nas marcas analisadas.

Por meio da PCA apresentada na Figura 5.12 é possível observar uma maior dispersão para os leites semidesnatados de diferentes marcas, decorrente do seu teor de gordura se enquadrar em uma larga faixa de valores (Tabela 4.II). Portanto, dependendo da marca do leite semidesnatado, seu teor de gordura pode estar mais próximo do leite desnatado ou do leite integral. Neste caso, observa-se que as amostras de leite integral estão relacionadas com valores positivos de PC1, enquanto as

amostras de leites desnatados com valores negativos de PC1. Verifica-se também uma correlação dos leites integrais com valores positivos de PC2.

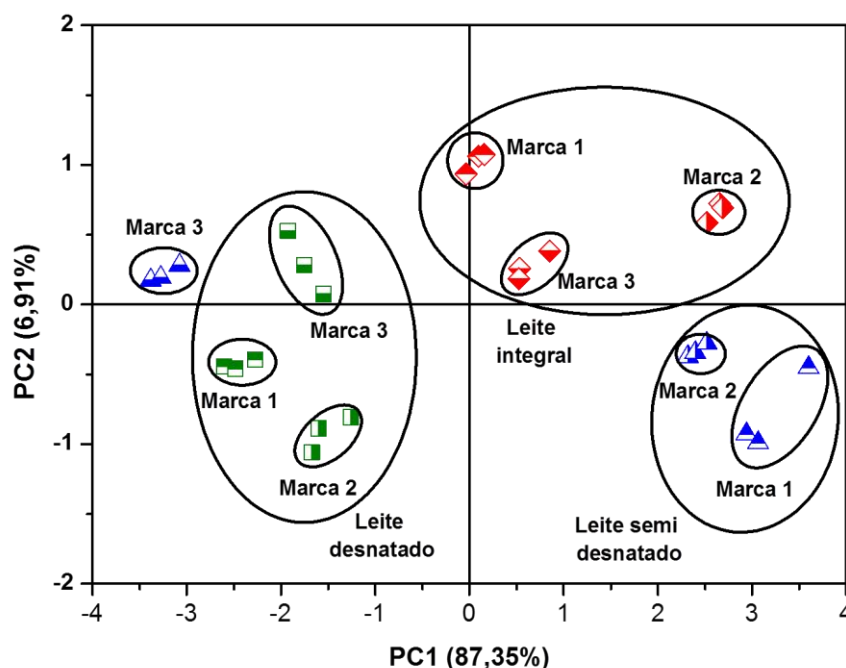


Figura 5.12 Gráfico de PCA das 9 amostras de leite analisadas pela LE.

* Cor vermelha = leite integral; Cor azul = leite semi desnatado; Cor verde = leite desnatado.

5.2.1.2 Detecção de tetraciclina em água destilada

Para avaliar se a LE seria capaz de identificar a tetraciclina no leite, realizou-se um teste inicial com amostras de água destilada contaminadas com diferentes concentrações de tetraciclina (1, 5, 25, 50, 100, 200 e 300 ppb). A Figura 5.13 ilustra o PCA para as amostras de água destilada contaminadas, sendo que os dados de variância apresentados foram obtidos com as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), que correspondem a 75,07% de toda a informação coletada pela LE. Por meio desta observa-se que houve discriminação entre as amostras com diferentes concentrações de tetraciclina.

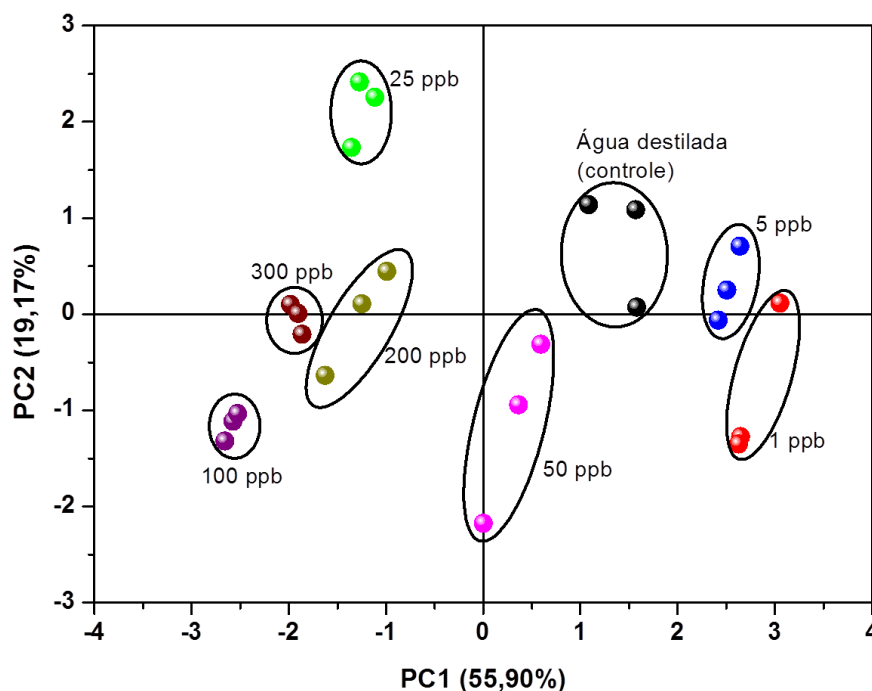


Figura 5.13 PCA das amostras de água destilada contaminadas com tetraciclina.

*● água destilada controle; ● = água destilada contaminada com 1 ppb de tetraciclina; ● = água destilada contaminada com 5 ppb de tetraciclina; ● = água destilada contaminada com 25 ppb de tetraciclina; ● = água destilada contaminada com 50 ppb de tetraciclina; ● = água destilada contaminada com 100 ppb de tetraciclina; ● = água destilada contaminada com 200 ppb de tetraciclina; ● = água destilada contaminada com 300 ppb de tetraciclina;

5.2.1.3 Amostras contaminadas com tetraciclina

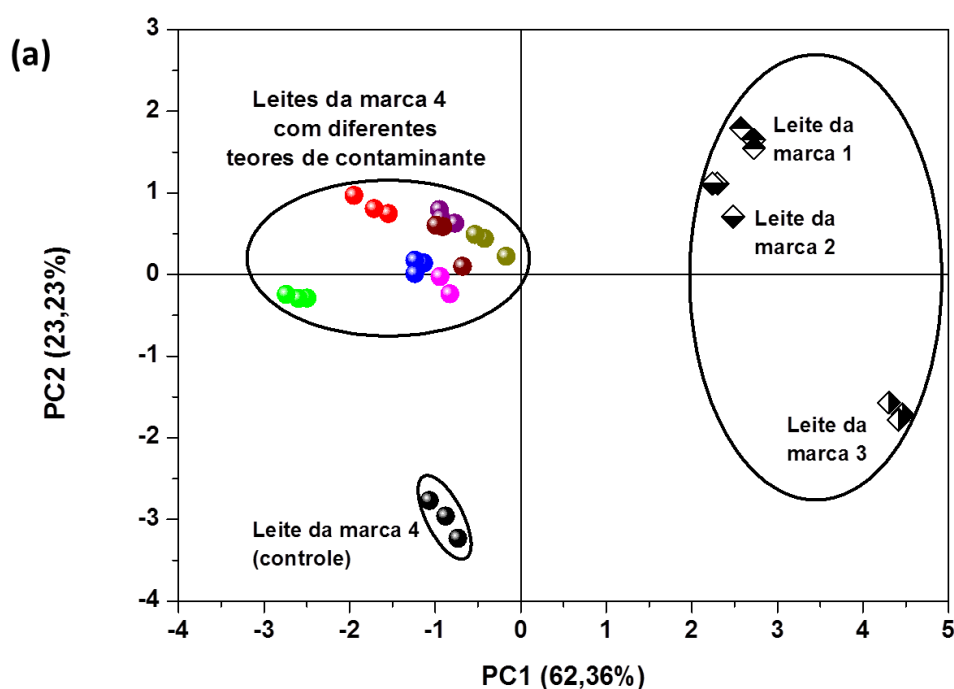
Nos PCAs apresentados neste tópico, os leites utilizados para a classificação ilustrada na seção 5.2, e o leite (controle) utilizado para preparar as amostras contaminadas com tetraciclina está representado pela cor preta e, cada concentração é representada por uma cor específica. Os dados serão apresentados de acordo com o teor de gordura.

5.2.1.3.1 Leites integrais

Os gráficos de PCA obtidos para os leites integrais contaminados com diferentes concentrações de tetraciclina são apresentado na Figura 5.14. Na Figura 5.14 (a) pode-se observar que houve a separação dos leites integrais

sem contaminação e dos contaminados. Utilizando-se apenas os dados dos leites contaminados e da amostra controle foi gerada uma nova PCA, como pode ser visto na Figura 5.14 (b). Nesta PCA, observa-se de maneira mais detalhada que a LE utilizada foi capaz de diferenciar as diferentes concentrações de tetraciclina nas amostras de leite e, neste caso foi capaz de distinguir essas concentrações em dois novos agrupamentos, sendo esses de baixa e alta concentração de tetraciclina.

Os dados de variância apresentados em ambos PCAs foram obtidos com as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), e a soma de ambos os componentes correspondem a 85,59% e 79,23% de toda a informação coletada pela LE, para as PCAs da Figura 5.14(a) e 5.14(b), respectivamente. Para a PCA da Figura 5.14(a) houve uma maior correlação entre o eixo PC1 (62,36% da informação total) e leites contaminados e sem contaminação. Já na Figura 5.14(b) observa-se que a correlação entre o eixo da PC1 e PC2 com as amostras analisadas são próximas.



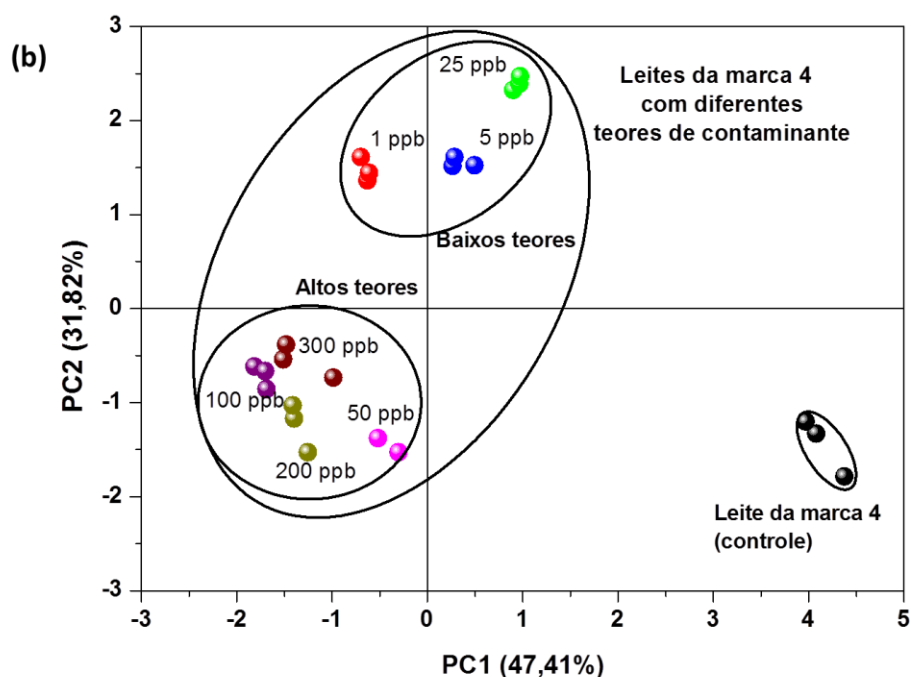


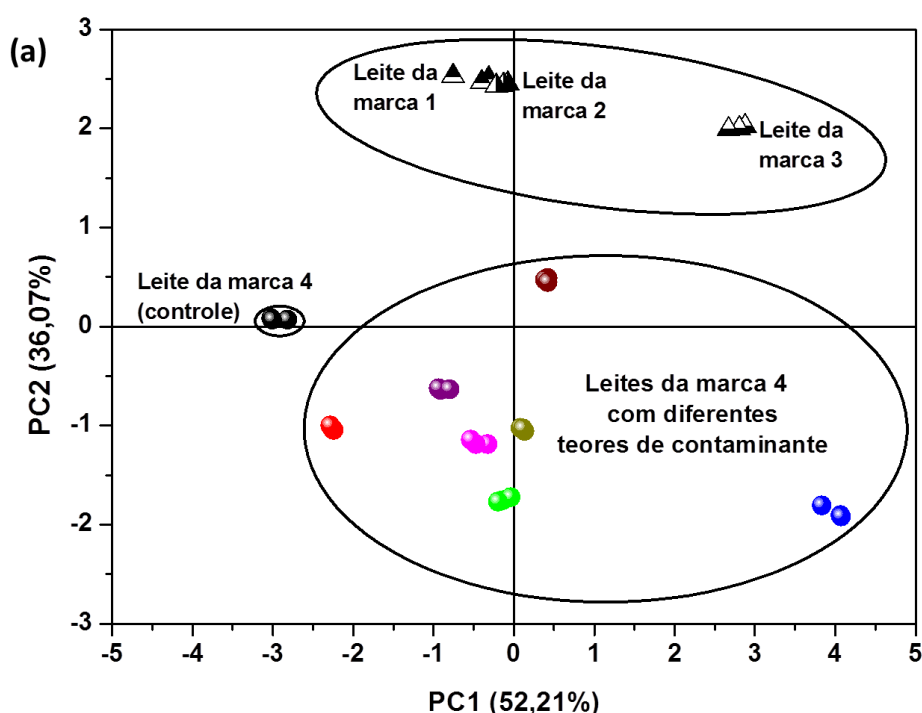
Figura 5.14 PCAs dos leites integrais (a) contendo todos os leites integrais não contaminados (marca 1,2,3 e 4(controle)) e leites contaminados (leites da marca 4 contaminados) e, (b) contendo somente o leite da marca 4 utilizado como controle e suas amostras contaminadas (leites da marca 4 contaminados).

*●= leite da marca 4 (controle); ● = leite da marca 4 contaminado com 1 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 5 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 25 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 50 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 100 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 200 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 300 ppb de tetraciclina; Os diferentes ♦ representam as diferentes marcas de leite integral utilizadas, que não foram contaminadas com tetraciclina.

5.2.1.3.2 Leites semidesnatados

A Figura 5.15 ilustra os gráficos PCA para os leites semidesnatados. Por meio das PCAs apresentadas na Figura 5.15 observa-se que a LE conseguiu discriminar as diferentes concentrações de tetraciclina e discriminou leites não contaminados dos contaminados. A Figura 5.15(b) foi obtida levando-se em consideração apenas as amostras de leite

contaminadas e controle. Nela pode-se observar que não houve uma separação das amostras contaminadas em um grupo específico, como foi observado na Figura 5.14. Essa menor discriminação pode ser decorrente da faixa variável de teor de gordura que os leites semidesnatados podem apresentar. Os dados de variância apresentados em ambas as PCAs foram obtidos com as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), que correspondem a 88,28% e 89,89% de toda a informação coletada pela LE, para as PCAs da Figura 5.15(a) e 5.15(b) respectivamente. Para ambas as PCAs houve uma maior correlação entre o eixo PC1 (52,21% e 73,93% da informação total (a) e (b)) e leites contaminados e sem contaminação, respectivamente. Neste caso, temos que as amostras de leite que não deram origem as amostras contaminadas se encontram na parte positiva do PC2 e, as amostras contaminadas com seu branco se encontram, em sua maioria, na parte negativa do PC2.



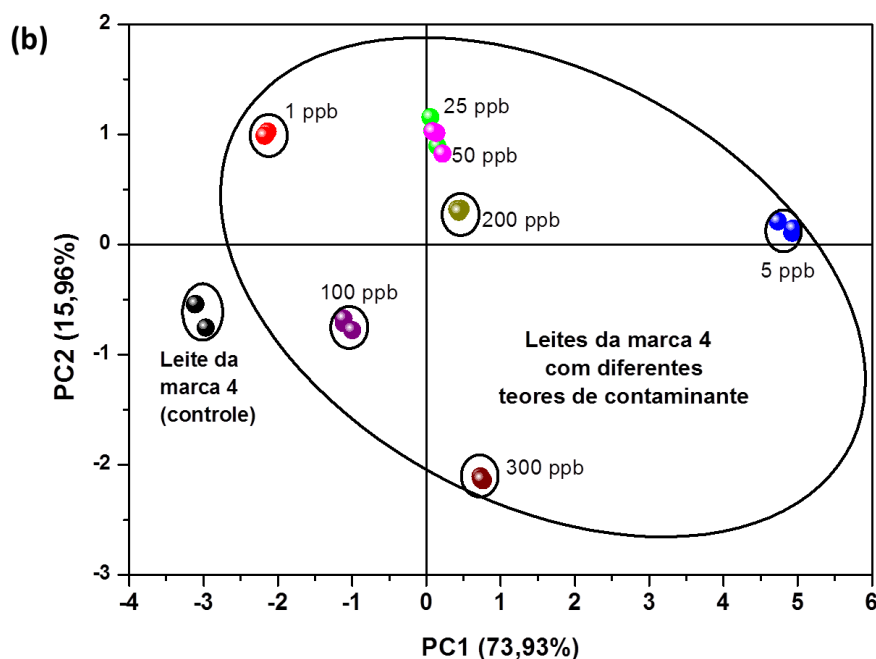


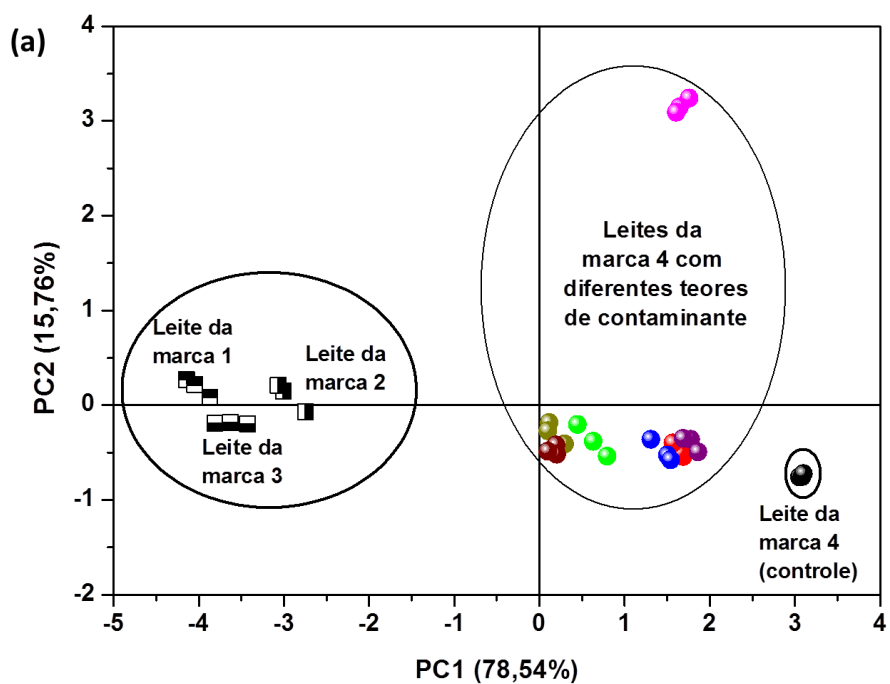
Figura 5.15 PCAs dos leites semi desnatados (a) contendo todos os leites semi desnatados não contaminados (marca 1,2,3 e 4(controle)) e leites contaminados (leites da marca 4 contaminados) e, (b) contendo somente o leite da marca 4 utilizado como controle e suas amostras contaminadas (leites da marca 4 contaminados).

*●= leite da marca 4 (controle); ● = leite da marca 4 contaminado com 1 ppb de tetraciclina; ●= leite da marca 4 contaminado com 5 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 25 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 50 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 100 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 200 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 300 ppb de tetraciclina; Os diferentes ▲ representam as diferentes marcas de leite integral utilizadas, que não foram contaminadas com tetraciclina.

5.2.1.3.3 Leites desnatados

A Figura 5.16 apresenta os gráficos de PCA para os leites desnatados. Utilizando-se apenas os dados dos leites contaminados e da amostra controle foi gerada uma nova PCA (Figura 5.16(b)), como pode ser visto na Por meio dessas observa-se que houve uma boa discriminação entre leites contaminados e não contaminados, além de conseguir discriminar as diferentes concentrações de tetraciclina. Os dados de variância apresentados

em ambas as PCAs foram obtidos com as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), as quais correspondem a 94,3% e 83,34% de toda a informação coletada pela LE, para as PCAs da Figura 5.16(a) e 5.16(b) respectivamente. Para ambas as PCAs houve uma maior correlação entre o eixo PC1 (78,54% e 57,22% da informação total, respectivamente para (a) e (b)) e leites contaminados e sem contaminação. Na Figura 5.16(a) as amostras contaminadas e seu branco se encontram na parte positiva da PC1 e os leites não contaminados na parte negativa desta.



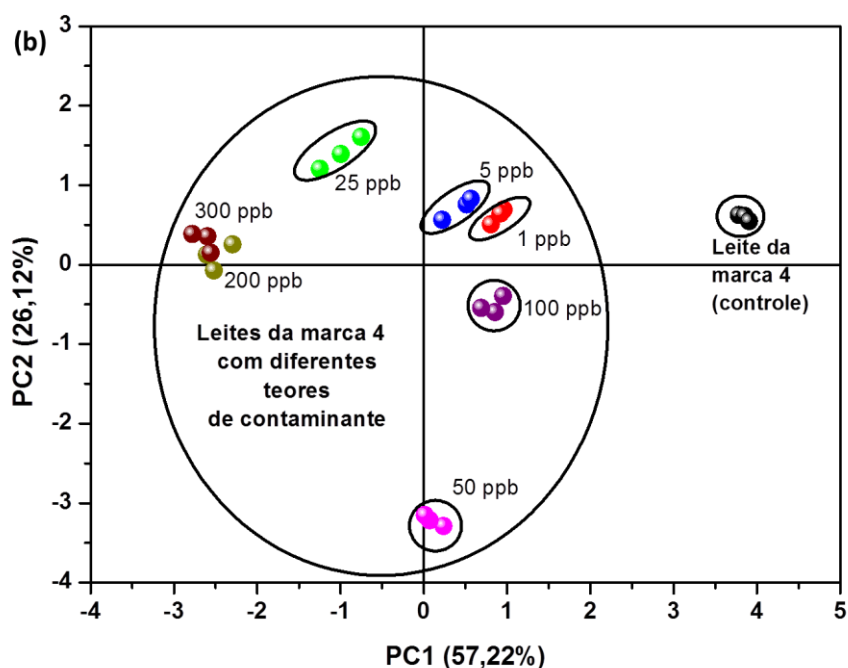


Figura 5.16 PCAs dos leites semi desnatados (a) contendo todos os leites semi desnatados não contaminados (marca 1,2,3 e 4(controle)) e leites contaminados (leites da marca 4 contaminados) e, (b) contendo somente o leite da marca 4 utilizado como controle e suas amostras contaminadas (leites da marca 4 contaminados).

*●= leite da marca 4 (controle); ● = leite da marca 4 contaminado com 1 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 5 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 25 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 50 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 100 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 200 ppb de tetraciclina; ● = leite da marca 4 contaminado com 300 ppb de tetraciclina; Os diferentes ■ representam as diferentes marcas de leite integral utilizadas, que não foram contaminadas com tetraciclina.

Foi observado que os leites utilizados como controle (leite da marca 4 utilizado para produção de amostras contaminadas com tetraciclina), se mantiveram em agrupamentos próximos (nos gráficos de PCA) às amostras contaminadas. Isso pode ser explicado pelo fato de que a única diferença entre ambos era a presença de tetraciclina.

Os valores detectados pela LE foram comparados com outras técnicas, relatadas na literatura (Tabela 5.VI), utilizadas para a determinação

de tetraciclina no leite e em outras amostras. Na Tabela 5.VI. pode-se observar que a menor concentração que foi detectada pela LE foi próximo aos limites de detecção obtidos pela técnica de HPLC e, abaixo dos valores detectados por alguns outros sensores. Além disso, a LE detectou valores de concentração de antibiótico abaixo daqueles detectados por kits comerciais. [124]

Tabela 5.VI Comparação das técnicas de detecção de tetraciclina.

Técnica		Limite de detecção	Amostra	Referências
HPLC		1,5ppb – 2ppb	Leite, alimentos	[125, 126]
Sensores	Eletrodo de grafite-poliuretana	1242ppb	Água	[127]
	Eletrodo impresso de ouro	426ppb	Alimentos e produtos farmacêuticos	
	Micro eletrodo de ouro modificado	83ppb	Água	
	Sensor de Fe/Zn-MMT	5ppb	Alimentos	
Língua eletrônica		1ppb *	Leite	Resultados deste trabalho

*Menor concentração medida.

6 CONCLUSÕES

As nanofibras de PA/PA6 utilizadas como camada ativa da LE mostraram-se promissoras para aplicação em sensores utilizados na avaliação de tipos de leites UHT em relação: i) ao teor de gordura e ii) a presença do contaminante tetraciclina. Nota-se ainda que a adição de PAni alterou o diâmetro das fibras, mas outras propriedades físico-químicas da PA6 não foram drasticamente afetadas. A caracterização elétrica evidenciou que as diferentes porcentagens de PAni nas fibras de PA6 teve pouca influencia nas respostas elétricas, mas foi eficiente para realizar a classificação e separação das amostras de leite. Para efeitos de comparação com os resultados apresentados nesta dissertação, uma proposta de trabalho futuro é a produção de nanofibras de Nylon que possam ser modificadas superficialmente por filmes automontados (LbL) de PAni, utilizando soluções de concentrações variadas. Neste caso poderá ser verificado se o filme de PAni depositado superficialmente nas nanofibras exercerá maior influência nas propriedades elétricas das mesmas.

De maneira geral, foi possível verificar que as unidades sensoriais da LE mostraram-se eficientes na discriminação de leites contaminados com tetraciclina em teores até 100 vezes mais baixos do que o valor permitido por órgãos de fiscalização. Nota-se também que o conjunto de sensores conseguiu diferenciar os diferentes leites UHT pelo seu teor de gordura. Dentre os métodos utilizados para detecção de tetraciclina em laboratório, a LE mostra-se como uma opção interessante, visto que a menor concentração de antibiótico detectada é inferior ao limite de detecção atingidos por métodos tradicionais, ou em alguns casos igual aquele apresentado pela técnica de HPLC. Contudo, comparada à técnica de HPLC a LE é de mais fácil manuseio e o tempo de análise tende a ser mais curto (cerca de 30 minutos por amostra).

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como continuação deste trabalho propõe-se:

- Realizar um estudo mais detalhado sobre a influencia da PAni na resposta elétrica do sensor, verificando se a adição de maiores porcentagens de PAni pode melhorar a sensibilidade e limite de detecção do sistema;
- Avaliar se a utilização de unidades sensoriais diversificadas pode resultar num melhor desempenho da língua eletrônica para análise de leites. Uma das possibilidades é a utilização de uma unidade sensorial com fibras recobertas com um filme ultrafino (por LbL) de um material condutor;
- Utilização de outras técnicas de análise estatística para avaliação da resposta sensorial;
- Avaliar a resposta deste sistema para amostras reais de leite.

8 PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTES AO TRABALHO DE MESTRADO

8.1 Resumos em anais de congresso

- V. P. Scagion, K. Y. Sakamoto, J. E. Oliveira, L. A. Mercante, D. S. Correa, M. D. Ferreira, L. H. C. Mattoso. Caracterização de nanofibras poliméricas de PA6 e PA6/PANI para aplicação como camada sensível em eletrodos nanoestruturados. VIII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, Juiz de Fora – MG, 2014.
- V. P. Scagion, L. A. Mercante, J. E. Oliveira, L. H. C. Mattoso, M. D. Ferreira, D. S. Correa. Characterization of Nylon 6/PANI polymeric nanofibers for application in chemical sensors. XIII Encontro da SBPMat, João Pessoa –PE, 2014.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neto, A.P., et al., *Consenso brasileiro de osteoporose 2002*. Rev Bras Reumatol, 2002. **42**(6): p. 343-54.
2. Bedani, R. and E.A. Rossi, *O consumo de cálcio ea osteoporose*. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, 2005. **26**(1): p. 3-14.
3. ; Available from: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagrop/producaoagrop/abate-leite-couro-ovos_201303_publ_completa.pdf.
4. Brito, J.R.F. and J.C. Dias, *A qualidade do leite*. 1998, Embrapa/Tortuga.
5. Okada, I.A., et al., *Evaluation of lead and cadmium levels in milk due to environmental contamination in the Paraíba Valley region of Southeastern Brazil*. Revista de Saúde Pública, 1997. **31**(2): p. 140-143.
6. de Oliveira PINTO, C.L., M.L. Martins, and M.C.D. Vanetti, *Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas*. Ciênc. Tecnol. Aliment, 2006. **26**(3): p. 645-651.
7. Nero, L.A., et al., *Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre Listeria monocytogenes e Salmonella spp.* Ciênc. Tecnol. Aliment, 2007. **27**(1): p. 201-204.
8. Pfenning, A.P., et al., *Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol residues in milk by gas chromatography with electron capture detection*. Journal of AOAC international, 1997. **81**(4): p. 714-720.
9. Suzuki, T., et al., *Determination of chlorinated pesticide residues in foods. I. Rapid screening method for chlorinated pesticides in milk*. Journal-Association of Official Analytical Chemists, 1979. **62**(3): p. 681-684.
10. Denobile, M. and E.d.S. Nascimento, *Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. **40**(2).
11. Straub, R., M. Linder, and R.D. Voyksner, *Determination of .beta.-lactam residues in milk using perfusive-particle liquid chromatography combined with ultrasonic nebulization electrospray mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(21): p. 3651-3658.
12. Lara, F.J., et al., *Multiresidue Method for the Determination of Quinolone Antibiotics in Bovine Raw Milk by Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(22): p. 7665-7673.
13. NASCIMENTO, G.G.F.d., V. MAESTRO, and M.S.P.d. CAMPOS, *Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP*. Revista de Nutrição, 2001. **14**: p. 119-124.
14. Prado, C.K. and M. Machinski Junior, *Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclina em leite: uma revisão*. Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso), 2011. **70**: p. 448-456.
15. Conzuelo, F., et al., *Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracycline antibiotics residues in milk*. Analytica chimica acta, 2012. **737**: p. 29-36.
16. Kishida, K., *Simplified extraction of tetracycline antibiotics from milk using a centrifugal ultrafiltration device*. Food Chemistry, 2011. **126**(2): p. 687-690.
17. Tan, H., et al., *Determination of tetracycline in milk by using nucleotide/lanthanide coordination polymer-based ternary complex*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **50**: p. 447-452.

18. Moreira, F.T.C., et al., *New biomimetic sensors for the determination of tetracycline in biological samples: Batch and flow mode operations*. Analytical Methods, 2010. **2**(12): p. 2039-2045.
19. Zhao, H., et al., *Amperometric Sensor for Tetracycline Determination Based on Molecularly Imprinted Technique*. Procedia Environmental Sciences, 2013. **18**: p. 249-257.
20. Guanghui, S., et al., *Electrochemical Aptasensor Based on Prussian Blue-Chitosan-Glutaraldehyde for the Sensitive Determination of Tetracycline*. Nano-Micro Letters, 2014. **6**(2): p. 143-152.
21. Jeon, M., et al., *Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk*. Microchemical Journal, 2008. **88**(1): p. 26-31.
22. Furusawa, N., *Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent*. Talanta, 2003. **59**(1): p. 155-159.
23. Walsh, C., *Antibiotics: actions, origins, resistance*. 2003: American Society for Microbiology (ASM).
24. Pereira-Maia, E.C., et al., *Tetracyclines and glycolcyclines: An overview*. Química Nova, 2010. **33**(3): p. 700-706.
25. Tan, H. and Y. Chen, *Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium (III) for detection of tetracycline in milk*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012. **173**(0): p. 262-267.
26. Pereira-Maia, E.C., et al., *Tetraciclina e gliciliciclina: uma visão geral*. Quím Nova, 2010. **33**(3): p. 700-706.
27. Conzuelo, F., et al., *Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk*. Analytica Chimica Acta, 2012. **737**(0): p. 29-36.
28. Kurittu, J., et al., *A Group-Specific Microbiological Test for the Detection of Tetracycline Residues in Raw Milk*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(8): p. 3372-3377.
29. Andersen, W.C., et al., *Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2005. **529**(1-2): p. 145-150.
30. Kurittu, J., et al. *A group-specific microbiological test for the detection of tetracycline residues in raw milk*. Journal of agricultural and food chemistry 2000 [cited 48 8]; 3372-3377].
31. Dasgupta, S., W.B. Hammond, and W.A. Goddard, *Crystal structures and properties of nylon polymers from theory*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(49): p. 12291-12301.
32. Lehmann, D. and K. Titzschkau, *Process for the condensation of polyamides*. 2006, Google Patents.
33. Cho, D., E. Zhmayev, and Y.L. Joo, *Structural studies of electrospun nylon 6 fibers from solution and melt*. Polymer, 2011. **52**(20): p. 4600-4609.
34. Li, Y., Z. Huang, and Y. Lü, *Electrospinning of nylon-6,6,1010 terpolymer*. European Polymer Journal, 2006. **42**(7): p. 1696-1704.
35. Huang, Z.-M., et al., *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*. Composites Science and Technology, 2003. **63**(15): p. 2223-2253.
36. Hong, K.H., K.W. Oh, and T.J. Kang, *Polyaniline-nylon 6 composite fabric for ammonia gas sensor*. Journal of Applied Polymer Science, 2004. **92**(1): p. 37-42.

37. Fuenmayor, C.A., et al., *Direct In Situ Determination of Ascorbic Acid in Fruits by Screen-Printed Carbon Electrodes Modified with Nylon-6 Nanofibers*. *Electroanalysis*, 2014. **26**(4): p. 704-710.
38. Granato, F., et al., *Disposable electrospun electrodes based on conducting nanofibers*. *Electroanalysis*, 2008. **20**(12): p. 1374-1377.
39. Steffens, C., et al., *Bio-inspired sensor for insect pheromone analysis based on polyaniline functionalized AFM cantilever sensor*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. **191**(0): p. 643-649.
40. Correa, D.S., et al., *Nanostructured Conjugated Polymers in Chemical Sensors: Synthesis, Properties and Applications*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2014. **14**(9): p. 6509-6527.
41. Varela, H., et al., *Materiais para cátodos de baterias secundárias de lítio*. *Química Nova*, 2002. **25**(2): p. 287-299.
42. Santos Jr, J., L. Mattoso, and A. Motheo, *Investigation of corrosion protection of steel by polyaniline films*. *Electrochimica Acta*, 1998. **43**(3): p. 309-313.
43. Medeiros, E., et al., *Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 2: Aplicações em sensores*. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2012. **7**(3): p. 144-158.
44. Medeiros, E.S., J. Oliveira Filho, and L. Mattoso, *Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: Introdução aos polímeros condutores*. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2012. **7**(2): p. 62-77.
45. Liu, H., et al., *Polymeric nanowire chemical sensor*. *Nano Letters*, 2004. **4**(4): p. 671-675.
46. Macdiarmid, A.G., et al., *Polyaniline: Protonic Acid Doping to the Metallic Regime*. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 1985. **125**(1): p. 309-318.
47. Bhadra, S., et al., *Progress in preparation, processing and applications of polyaniline*. *Progress in Polymer Science*, 2009. **34**(8): p. 783-810.
48. Foot, P. and R. Simon, *Electrochromic properties of conducting polyanilines*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 1989. **22**(11): p. 1598.
49. MacDiarmid, A.G. and A.J. Epstein, *Polyanilines: a novel class of conducting polymers*. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 1989. **88**: p. 317-332.
50. Lux, F., *Properties of electronically conductive polyaniline: a comparison between well-known literature data and some recent experimental findings*. *Polymer*, 1994. **35**(14): p. 2915-2936.
51. Mattoso, L.H.C., *Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades*. *Química Nova*, 1996. **19**(4): p. 388-399.
52. Macdiarmid, A.G., et al., *Polyaniline: a new concept in conducting polymers*. *Synthetic Metals*, 1987. **18**(1-3): p. 285-290.
53. Kang, E.T., K.G. Neoh, and K.L. Tan, *Polyaniline: A polymer with many interesting intrinsic redox states*. *Progress in Polymer Science*, 1998. **23**(2): p. 277-324.
54. Geniès, E.M., et al., *Polyaniline: A historical survey*. *Synthetic Metals*, 1990. **36**(2): p. 139-182.
55. Masters, J.G., et al., *Polyaniline: Allowed oxidation states*. *Synthetic Metals*, 1991. **41**(1-2): p. 715-718.
56. Virji, S., et al., *Polyaniline Nanofiber Gas Sensors: Examination of Response Mechanisms*. *Nano Letters*, 2004. **4**(3): p. 491-496.
57. Bossi, A., et al., *An Assay for Ascorbic Acid Based on Polyaniline-Coated Microplates*. *Analytical Chemistry*, 2000. **72**(18): p. 4296-4300.
58. Aussawasathien, D., J.H. Dong, and L. Dai, *Electrospun polymer nanofiber sensors*. *Synthetic Metals*, 2005. **154**(1-3): p. 37-40.
59. Costa, R.G.F., et al., *Eletrofiação de Polímeros em Solução: parte I: fundamentação Teórica*. *Polímeros*, 2012. **22**: p. 170-177.

60. Instrumentação, E., *Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica*. Polímeros, 2012. **22**(2): p. 170-177.
61. Doshi, J. and D.H. Reneker. *Electrospinning process and applications of electrospun fibers*. in *Industry Applications Society Annual Meeting, 1993., Conference Record of the 1993 IEEE*. 1993. IEEE.
62. Theron, S.A., E. Zussman, and A.L. Yarin, *Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions*. Polymer, 2004. **45**(6): p. 2017-2030.
63. Instrumentação, E., *Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte II: Aplicações e Perspectivas*. Polímeros, 2012. **22**(2): p. 178-185.
64. Chronakis, I.S., *Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process—A review*. Journal of Materials Processing Technology, 2005. **167**(2–3): p. 283-293.
65. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(3): p. 325-347.
66. Zeng, F.-W., et al., *Humidity sensors based on polyaniline nanofibres*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010. **143**(2): p. 530-534.
67. Oliveira, J.E., et al., *Modification of electrospun nylon nanofibers using layer-by-layer films for application in flow injection electronic tongue: Detection of paraoxon pesticide in corn crop*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012. **171–172**(0): p. 249-255.
68. Liu, H., et al., *Polymeric Nanowire Chemical Sensor*. Nano Letters, 2004. **4**(4): p. 671-675.
69. Wang, X., et al., *Electrospun Nanofibrous Membranes for Highly Sensitive Optical Sensors*. Nano Letters, 2002. **2**(11): p. 1273-1275.
70. Wang, X., et al., *Electrostatic Assembly of Conjugated Polymer Thin Layers on Electrospun Nanofibrous Membranes for Biosensors*. Nano Letters, 2004. **4**(2): p. 331-334.
71. Costa, R.G., et al., *Electrospinning of polymers in solution: part II: applications and perspectives*. Polímeros, 2012. **22**(2): p. 178-185.
72. Oliveira, J.E., et al., *Sensor Array for Water Analysis Based on Interdigitated Electrodes Modified With Fiber Films of Poly(Lactic Acid)/Multiwalled Carbon Nanotubes*. Sensors Journal, IEEE, 2013. **13**(2): p. 759-766.
73. Chen, D., et al. *Polyaniline nanofiber gas sensors by direct-write electrospinning*. in *Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2011 IEEE 24th International Conference on*. 2011. IEEE.
74. Deisingh, A.K., D.C. Stone, and M. Thompson, *Applications of electronic noses and tongues in food analysis*. International Journal of Food Science & Technology, 2004. **39**(6): p. 587-604.
75. Riul Jr, A., et al., *Recent advances in electronic tongues*. Analyst, 2010. **135**(10): p. 2481-2495.
76. Escuder-Gilabert, L. and M. Peris, *Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis*. Analytica Chimica Acta, 2010. **665**(1): p. 15-25.
77. Vlasov, Y., A. Legin, and A. Rudnitskaya, *Electronic tongues and their analytical application*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002. **373**(3): p. 136-146.
78. Ghasemi-Varnamkhasti, M., et al., *Electronic and bioelectronic tongues, two promising analytical tools for the quality evaluation of non alcoholic beer*. Trends in Food Science & Technology, 2011. **22**(5): p. 245-248.
79. Riul Jr, A., et al., *Wine classification by taste sensors made from ultra-thin films and using neural networks*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2004. **98**(1): p. 77-82.

80. Vlasov, Y., et al., *Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report)*, in *Pure and Applied Chemistry*. 2005. p. 1965.
81. Baldwin, E.A., et al., *Electronic noses and tongues: Applications for the food and pharmaceutical industries*. *Sensors*, 2011. **11**(5): p. 4744-4766.
82. Krantz-Rülcker, C., et al., *Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review*. *Analytica chimica acta*, 2001. **426**(2): p. 217-226.
83. Campos, I., et al., *A method of pulse array design for voltammetric electronic tongues*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012. **161**(1): p. 556-563.
84. Alcañiz, M., et al., *Design of an electronic system and its application to electronic tongues using variable amplitude pulse voltammetry and impedance spectroscopy*. *Journal of Food Engineering*, 2012. **111**(1): p. 122-128.
85. Riul, A., et al., *Artificial Taste Sensor: Efficient Combination of Sensors Made from Langmuir–Blodgett Films of Conducting Polymers and a Ruthenium Complex and Self-Assembled Films of an Azobenzene-Containing Polymer*. *Langmuir*, 2001. **18**(1): p. 239-245.
86. Riul Jr, A., et al., *An artificial taste sensor based on conducting polymers*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003. **18**(11): p. 1365-1369.
87. Parra, V., et al., *Electronic tongue based on chemically modified electrodes and voltammetry for the detection of adulterations in wines*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006. **118**(1–2): p. 448-453.
88. Casilli, S., et al., *Langmuir–Blodgett and Langmuir–Schaefer films of homoleptic and heteroleptic phthalocyanine complexes as voltammetric sensors:: Applications to the study of antioxidants*. *Applied Surface Science*, 2005. **246**(4): p. 304-312.
89. Lvova, L., et al., *Detection of alcohols in beverages: An application of porphyrin-based Electronic tongue*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006. **118**(1–2): p. 439-447.
90. Paolesse, R., et al., *Porphyrin-based array of cross-selective electrodes for analysis of liquid samples*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2003. **95**(1–3): p. 400-405.
91. Borato, C.E., et al., *Layer-by-layer films of poly(o-ethoxyaniline), chitosan and chitosan-poly(methacrylic acid) nanoparticles and their application in an electronic tongue*. *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, 2006. **13**(5): p. 1101-1109.
92. Cetó, X., et al., *Determination of total polyphenol index in wines employing a voltammetric electronic tongue*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **732**(0): p. 172-179.
93. Riul Jr, A., et al., *An electronic tongue using polypyrrole and polyaniline*. *Synthetic Metals*, 2003. **132**(2): p. 109-116.
94. Martínez-Máñez, R., et al., *An "electronic tongue" design for the qualitative analysis of natural waters*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005. **104**(2): p. 302-307.
95. Riul Jr, A., et al., *An electronic tongue using polypyrrole and polyaniline*. *Synthetic Metals*, 2003. **132**(2): p. 109-116.
96. Sundic, T., et al. *Electronic tongue and electronic nose data fusion in classification with neural networks and fuzzy logic based models*. in *Instrumentation and Measurement Technology Conference, 2000. IMTC 2000. Proceedings of the 17th IEEE*. 2000.
97. Braga, G.S., L.G. Paterno, and F.J. Fonseca, *Performance of an electronic tongue during monitoring 2-methylisoborneol and geosmin in water samples*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012. **171–172**(0): p. 181-189.
98. Neto, J.M.M. and G.C. Moita, *Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados*. *Química Nova*, 1998. **21**(4): p. 467-469.
99. Beebe, K.R., R.J. Pell, and M.B. Seasholtz, *Chemometrics: a practical guide*. 1998.

100. Braga, G.d.S., *SISTEMA AUTOMATIZADO BASEADO EM LÍNGUA ELETRÔNICA PARA MONITORAÇÃO DE ÁGUA PARA ABASTECIMENTO URBANO*. 2012, Universidade de São Paulo.
101. Kara, D., *Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis*. Food Chemistry, 2009. **114**(1): p. 347-354.
102. Ke, P., et al., *From macro to micro: structural biomimetic materials by electrospinning*. RSC Advances, 2014. **4**(75): p. 39704-39724.
103. in *Revista Abastecimento*. nov/dez 2012. p. 92.
104. Manzoli, A., et al., *Femtosecond laser ablation of gold interdigitated electrodes for electronic tongues*. Optics & Laser Technology, 2015. **69**(0): p. 148-153.
105. Taylor, D. and A. MacDonald, *AC admittance of the metal/insulator/electrolyte interface*. Journal of Physics D: Applied Physics, 1987. **20**(10): p. 1277.
106. Li, M., et al., *Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications*. Biomaterials, 2006. **27**(13): p. 2705-2715.
107. Picciani, P.H.S., et al., *Development of conducting polyaniline/poly(lactic acid) nanofibers by electrospinning*. Journal of Applied Polymer Science, 2009. **112**(2): p. 744-753.
108. da Silva, A.B. and R.E.S. Bretas, *Preparation and characterization of PA6/PAni-TSA nanofibers*. Synthetic Metals, 2012. **162**(17-18): p. 1537-1545.
109. Izumi, C.M.S., *Caracterização espectroscópica da polianilina em diferentes ambientes químicos*. 2006, Universidade de São Paulo.
110. Silva, R.S., et al., *Filme autosuportado de polianilina desdopada para aplicações anticorrosivas*. Polímeros, 2012. **22**: p. 288-294.
111. Lee, K.-H., et al., *Polarized FT-IR Study of Macroscopically Oriented Electrospun Nylon-6 Nanofibers*. Macromolecules, 2008. **41**(4): p. 1494-1498.
112. Liu, Y., et al., *Crystalline Morphology and Polymorphic Phase Transitions in Electrospun Nylon-6 Nanofibers*. Macromolecules, 2007. **40**(17): p. 6283-6290.
113. Izumi, C., et al., *Spectroscopic characterization of polyaniline doped with transition metal salts*. Synthetic metals, 2006. **156**(9): p. 654-663.
114. Tao, S., B. Hong, and Z. Kerong, *An infrared and Raman spectroscopic study of polyanilines co-doped with metal ions and H⁺*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2007. **66**(4): p. 1364-1368.
115. Pereira da Silva, J., et al., *Influence of thermal treatment on doped polyaniline studied by resonance Raman spectroscopy*. Macromolecules, 2000. **33**(8): p. 3077-3083.
116. Fukuda, T., et al., *Ir and Raman studies in three polyanilines with different oxidation level*. Synthetic Metals, 1995. **69**(1): p. 175-176.
117. Caracterização de Materiais, I., *Nanocompósitos de poliamida 6 e argila organofílica: estudo da cristalinidade e propriedades mecânicas*. Polímeros, 2011. **21**(1): p. 78-82.
118. Fornes, T.D. and D.R. Paul, *Crystallization behavior of nylon 6 nanocomposites*. Polymer, 2003. **44**(14): p. 3945-3961.
119. Jose, M.V., et al., *Morphology and mechanical properties of Nylon 6/MWNT nanofibers*. Polymer, 2007. **48**(4): p. 1096-1104.
120. Canevarolo Jr, S.V., *Técnicas de caracterização de polímeros*. Artliber, São Paulo, 2004. **430**(2004).
121. Pielichowski, K., et al., *Polyaniline-based catalysts characterized by dynamic DSC*. Applied Catalysis A: General, 1997. **161**(1-2): p. L25-L28.
122. Luo, K., N. Shi, and C. Sun, *Thermal transition of electrochemically synthesized polyaniline*. Polymer Degradation and Stability, 2006. **91**(11): p. 2660-2664.
123. Ding, L., X. Wang, and R.V. Gregory, *Thermal properties of chemically synthesized polyaniline (EB) powder*. Synthetic Metals, 1999. **104**(2): p. 73-78.

124. dos Santos, A.F.d.S., K.M.R. Duarte, and C.R. Pozzi, *Detecção de Resíduos de Antimicrobianos no Leite*. UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, 2014. **13**(3).
125. Yang, X.-Q., C.-X. Yang, and X.-P. Yan, *Zeolite imidazolate framework-8 as sorbent for on-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of tetracyclines in water and milk samples*. Journal of Chromatography A, 2013. **1304**(0): p. 28-33.
126. Cinquina, A.L., et al., *Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle*. Journal of Chromatography A, 2003. **987**(1-2): p. 227-233.
127. Gan, T., et al., *Simple and novel electrochemical sensor for the determination of tetracycline based on iron/zinc cations-exchanged montmorillonite catalyst*. Talanta, 2014. **121**: p. 187-193.