

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 21/02/2021.

Thulio César Pereira

**Sensores eletroquímicos baseados em polímeros
molecularmente impressos sobre superfícies contendo
grafeno e nanopartículas metálicas para a determinação de
ácidos orgânicos na vinhaça de cana-de-açúcar**

Tese apresentada ao Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (IQ/UNESP) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

P436s Pereira, Thulio César
Sensores eletroquímicos baseados em polímeros
molecularmente impressos sobre superfícies contendo grafeno e
nanopartículas metálicas para a determinação de ácidos
orgânicos na vinhaça de cana-de-açúcar / Thulio César Pereira. –
Araraquara : [s.n.], 2019
113 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: Nelson Ramos Stradiotto


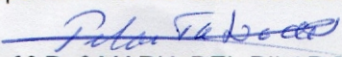
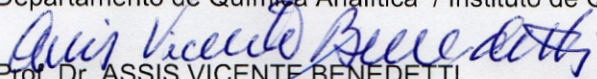
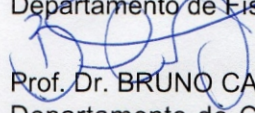
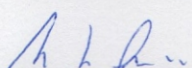
1. Vinhaça. 2. Ácidos orgânicos. 3. Impressão molecular.
4. Eletrodeposição. 5. Grafeno. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Sensores eletroquímicos baseados em polímeros molecularmente impressos sobre superfícies contendo grafeno e nanopartículas metálicas para a determinação de ácidos orgânicos na vinhaça de cana de açúcar"

AUTOR: THULIO CÉSAR PEREIRA**ORIENTADOR: NELSON RAMOS STRADIOTTO**

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


Prof. Dr. NELSON RAMOS STRADIOTTO
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara
Prof.^a Dr.^a MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara
Prof. Dr. ASSIS VICENTE BENEDETTI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara
Prof. Dr. BRUNO CAMPOS JANEGITZ
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAr - Araras
Prof. Dr. MARCELO FIRMINO DE OLIVEIRA
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 21 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES

1-DADOS PESSOAIS

Nome: Thulio César Pereira

Nacionalidade: Brasileiro

Nascimento: 27/08/1990

Naturalidade: Caxias/MA

Endereço profissional: Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Química de Araraquara – Departamento de Química Analítica
Rua Prof. Francisco Degni, n° 55, Bairro Quitandinha,
Araraquara, 14800-900, SP-Brasil

Telefone: (16) 3301-9581

Endereço eletrônico: tuliocs22@gmail.com

2-FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2015-2019

Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Química Araraquara - IQ/UNESP, Araraquara/SP, Brasil

Título da tese: Sensores eletroquímicos baseados em polímeros molecularmente impressos sobre superfícies contendo grafeno e nanopartículas metálicas para a determinação de ácidos orgânicos na vinhaça de cana-de-açúcar

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

2012-2014

Mestrado em Química

Universidade Federal do Maranhão-UFMA, São Luís/MA, Brasil

Título da dissertação: Desenvolvimento de método eletroanalítico para a determinação do teor de biodiesel no diesel por espectroscopia de impedância eletroquímica

Orientadora: Profa. Dra. Aldaléa Lopes Brandes Marques

2008-2012

Graduação em Licenciatura em Química

Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, Caxias/MA, Brasil

Título monografia: Desenvolvimento de um sistema de multipropulsão peristáltica alternativo de baixo custo aplicado à análise por injeção em fluxo

Orientador: Prof. MSc. Péricles Mendes Nunes

3-PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo completo submetido em periódicos

Pereira, Thulio César e Stradiotto, Nelson Ramos.

Electrochemical sensor for lactic acid based on molecularly imprinted polymers obtained on electrode modified with reduced graphene oxide and gold nanoparticles. *Electrochimica Acta*.

Artigos completos publicados em periódicos

Beluomini, Maisa Azevedo.; da Silva, Jose Luis.; de Sá, Acelino Cardoso.; Buffon, Edervaldo.; Pereira, Thulio César.; Stradiotto, Nelson Ramos. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymer on nanostructured carbon materials: A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 840, p. 343–366, 2019.

Delfino, José Rodeigues; Pereira, Thulio C.; Costa Viegas, Helmara D.; Marques, Edimar P.; Pupim Ferreira, Antônio A.; Zhang, Lei; Zhang, Jiujun; Brandes Marques, Aldaléa L. A simple and fast method to determine water content in biodiesel by electrochemical impedance spectroscopy. *Talanta*, v. 179, p. 753-759, 2018.

Pereira, Thulio César; Delfino, José R.; Ferreira A. P.; Barros, Fernando José S.; Marques, Edimar P.; Zhang, Jiujun; Marques, Aldaléa L. B. Stainless Steel Electrodes to determine biodiesel content in petroleum diesel fuel by electrochemical impedance spectroscopy. *Electroanalysis*, v. 29, p. 814-820, 2016.

Pereira, Thulio C. ; Conceição, Carlos A. F.; Khan, Alamgir; Fernandes, Raquel M. T.; Ferreira, Maira S.; Marques, Edimar P.; Marques, Aldaléa L. B. Application of electrochemical impedance spectroscopy: A phase behavior study of babaçu biodiesel-based microemulsions. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy (Print)*, v. 168, p. 60-64, 2016.

Resumos publicados em anais de congressos científicos

Pereira, T.C.; Stradiotto, N.R. Determination of lactic acid in sugarcane vinasse based on electrode modified with molecularly imprinted polymers, reduced graphene oxide and gold nanoparticles. **42° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ**, Joinville/SC, 2019.

Stradiotto, N.R.; Bufon, E.; **Pereira, T.C.**; Moreira, L.F.P.P. Electrochemical sensors for determination of sugars and organic acids in waste of bioethanol production. **47th IUPAC World Chemistry Congress - IUPAC**, Paris, França, 2019.

Pereira, T.C.; Stradiotto, N.R. Sensor for determination of malic acid in sugarcane vinasse based on electrode modified with polymer molecularly printed on reduced graphene oxide and copper nanoparticles. **Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XXII SIBEE**, Ribeirão Preto/SP, 2019.

*Aos meus pais, Martinha Mendes Pereira e Júlio
César Gomes Pereira (in memoriam), e à minha irmã,
Fernanda Mendes Pereira por todo amor e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e saúde.

Aos meus pais Julio César Gomes Pereira (*in memoriam*) e Martinha Mendes Pereira por todo o amor, incentivo e todos os sacrifícios.

À minha irmã Fernanda Mendes Pereira pelo amor, confiança.

À minha avó Joana Coutinho Pereira, por todo o amor.

Aos meus tios Francisco e Joana pela educação.

A todos os familiares, tios, tias primos e primas que mesmo longe continuaram torcendo para tudo dar certo nessa caminhada.

Ao prof. Nelson Ramos Stradiotto pela orientação, confiança, ensinamentos e convívio amigável durante esses anos.

Aos colegas de laboratório, José Luis, Maisa, Edervaldo, Josiel, João Carlos, Acelino, Daniel, Vitor, Luis Felipe, Gabriela, Valter, Max pela boa convivência.

A todos os amigos e amigas que fiz nesse período aqui em Araraquara, pela boa companhia nos momentos bons e ajuda nos momentos difíceis, que também estão lutando para alcançar seus objetivos.

A todos os professores e alunos do grupo de Eletroanalítica de Araraquara-GEAr pelos ensinamentos e convívio amigável.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Química de Araraquara pela oportunidade e estrutura oferecida nesse período

“Levanta e anda.”
(Emicida)

RESUMO

A vinhaça é um dos principais resíduos da indústria sucroalcooleira, obtida durante a produção do etanol na etapa de destilação, numa razão que varia de aproximadamente 10 a 14 litros para cada litro de etanol produzido. Apresenta uma coloração marrom escura, odor forte e desagradável, caracterizada também por baixos valores de pH e elevados valores de demanda química de oxigênio, o que tem relação com a elevada concentração de matéria orgânica presente. Apesar de ser considerada poluidora, ainda nos dias atuais a vinhaça vem sendo utilizada como fertilizante diretamente no solo dos próprios canaviais, principalmente devido à presença de fósforo, potássio e nitrogênio em sua composição. No entanto esta prática não estar sujeita a nenhuma fiscalização mais rígida e ao longo dos anos tem sido demonstrado que pode causar uma série de prejuízos ambientais. Nesse contexto pesquisas vêm sendo desenvolvidas com intuito de apontar destinos alternativos para a grande carga de vinhaça gerada anualmente. Uma opção atraente pode ser a aplicação de biorrefinarias, as quais permitem o aproveitamento das substâncias presentes neste resíduo. A fração orgânica da vinhaça é formada por uma série de compostos químicos de interesse, com destaque para os ácidos orgânicos, os quais são alguns dos principais subprodutos da fermentação microbiana de açúcares aplicada na produção do etanol. Esses compostos têm demonstrado importância nas mais diversas áreas de interesse, tais como alimentos, bebidas, medicina, cosméticos, biotecnologia e farmácia. Assim é de extrema importância o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a determinação desses compostos com sensibilidade, seletividade, rapidez e baixo custo. O presente trabalho propõe o desenvolvimento e aplicação de sensores eletroquímicos baseados em polímeros molecularmente impressos (MIP), como elementos de reconhecimento, obtidos em eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido (RGO) e nanopartículas de ouro (AuNPs) e cobre (CuNPs) para a determinação de ácido láctico e ácido málico, alguns dos principais ácidos orgânicos presentes na vinhaça de cana-de-açúcar. Os sensores desenvolvidos para a determinação do ácido láctico (GCE-RGO-AuNPs-MIP) e do ácido málico (GCE-RGO-CuNPs-MIP), foram caracterizados eletroquimicamente utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), morfologicamente com as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM), confirmando que as modificações foram realizadas com sucesso na superfície do eletrodo. Os resultados foram analisados utilizando as técnicas de VC e voltametria de pulso diferencial (DPV), utilizando a espécie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ como sonda eletroquímica. Os métodos desenvolvidos para o ácido láctico e ácido málico apresentaram baixos valores para LD ($8,9 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,6 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$) e LQ ($1,9 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente, com uma ampla faixa linear de trabalho, boa sensibilidade. Os sensores foram aplicados com êxito para a determinação dos ácidos na vinhaça de cana de açúcar, sendo determinada uma concentração de $2,32 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido láctico e $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido málico. Os ensaios de recuperação realizados demonstraram que o método desenvolvido apresentou boa exatidão, podendo ser considerado uma boa opção para a determinação de ácidos orgânicos em vinhaça de cana de açúcar, para o ácido láctico os valores recuperados variaram de 97,7 % a 105,1 %, para o ácido málico a variação foi de 97,4 % a 104%.

Palavras-chave: Sensores eletroquímicos. Vinhaça de cana-de-açúcar. Ácido láctico. Ácido málico. Polímeros Molecularmente Impressos. Grafeno. Nanopartículas metálicas.

ABSTRACT

Vinasse is one of the main residues of the sugar and alcohol industry, obtained during ethanol production in the distillation stage, in a ratio that varies from approximately 10 to 14 liters for each liter of ethanol produced. It has a dark brown color, strong and unpleasant odor, also characterized by low pH values and high values of chemical oxygen demand, which is related to the high concentration of organic matter present. Although considered polluting, still today vinasse has been used as a fertilizer directly in the soil of the sugarcane crops, mainly due to the presence of phosphorus, potassium and nitrogen in its composition. However this practice is not subject to any stricter supervision and over the years it has been shown that it can cause a lot of environmental damage. In this context, research has been carried out aiming to find alternative destinations for the large vinasse load generated annually. An attractive option may be the application of biorefineries, which allow the use of the substances present in this residue. The organic fraction of vinasse is formed by a series of chemical compounds of interest, especially organic acids, which are some of the main byproducts of microbial fermentation of sugars applied in ethanol production. These compounds have shown importance in many areas of interest, such as food, beverages, medicine, cosmetics, biotechnology and pharmacy. Thus, the development of analytical methods that allow the determination of these compounds with sensitivity, selectivity, speed and low cost is extremely important. The present work proposes the development and application of electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers (MIP), as recognition elements, obtained on modified electrodes with reduced graphene oxide (RGO) and metallic nanoparticles (gold and copper) the determination of lactic acid and malic acid, some of the main organic acids present in sugarcane vinasse. The sensors developed for the determination of lactic acid (GCE-RGO-AuNPs-MIP) and malic acid (GCE-RGO-CuNPs-MIP) were characterized electrochemically using the techniques of cyclic voltammetry (VC) and electrochemical impedance spectroscopy (EIE), morphologically with scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) techniques, confirming that the modifications were successfully performed on the electrode surface. The results were analyzed using VC and differential pulse voltammetry (DPV) techniques, using the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ as an electrochemical probe. The methods developed for lactic acid and malic acid presented low values for LOD ($8.9 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ and $6.6 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$) and LOQ ($1.9 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ and $2.2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$), respectively, with a wide working linear range, good sensitivity. The sensors were successfully applied for the determination of acids in sugarcane vinasse, with a concentration of $2.32 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ of lactic acid and $1.7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ of malic acid. The recovery tests performed showed that the developed method presented good accuracy and can be considered a good option for the determination of organic acids in sugarcane vinasse. For the lactic acid the values recovered ranged from 97.7% to 105.1. % for malic acid ranged from 97.4% to 104%.

Keywords: Electrochemical sensors. Sugarcane vinasse. Lactic acid. Malic acid. Molecularly Imprinted Polymers. Graphene. Metallic nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da molécula de ácido láctico	22
Figura 2- Estrutura da molécula de ácido málico.....	24
Figura 3- Esquema geral para o preparo de MIP.....	27
Figura 4- Estrutura da molécula do monômero o-PD.....	33
Figura 5- Estrutura da molécula de ácido acético 3 indólico.....	33
Figura 6- Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização do monômero o-PD $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ no eletrodo modificado GCE-RGO-AuNPs na presença de ácido láctico $2,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em tampão PBS $0,10$ mol L ⁻¹ pH 5,0.....	41
Figura 7- Esquema geral para o mecanismo de eletropolimerização do monômero o-PD na superfície do eletrodo modificado GCE-RGO-AuNPs.....	42
Figura 8- Representação do processo de impressão molecular para o ácido láctico na superfície do eletrodo GCE-RGO-AuNPs utilizando o-PD como monômero.....	43
Figura 9- Voltamogramas cíclicos para: (a) GCE, (b) GCE-RGO e (c) GCE-RGO-AuNPs em solução contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ numa concentração $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹	44
Figura 10- Gráficos de Nyquist para: (a) GCE, (b) GCE-RGO e (c) GCE-RGO-AuNPs em solução contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ numa concentração $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ . Figura interna: ajuste do circuito elétrico equivalente para os resultados obtidos.....	45
Figura 11- Voltamograms cíclicos para: (a) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a polimerização, (b) GCE-RGO-AuNPs-MIP após remoção da molécula molde, (c) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a religação com solução de ácido láctico e (d) GCE-RGO-AuNPs-NIP, utilizando uma solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ numa concentração $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹	46
Figura 12- Gráficos de Nyquist para: (a) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a polimerização, (b) GCE-RGO-AuNPs-MIP após remoção da molécula molde, (c) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a religação com solução de ácido láctico e (d) GCE-RGO-AuNPs-NIP, utilizando uma solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ numa concentração $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹	47
Figura 13- Voltamogramas cíclicos para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP após a remoção da molécula molde em diferentes velocidades de varredura, utilizando uma solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ como sonda eletroquímica. Inserção: relação entre as correntes de pico anódica e catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura.....	50
Figura 14- Imagens MEV-FEG para: (a) GCE-RGO, (b) GCE-RGO-AuNPs, (c) GCE-RGO-AuNPs-MIP, (d) GCE-RGO-AuNPs-NIP, (e) Espectro de EDX para GCE-RGO-AuNPs- e (f) Variação do diâmetro médio das AuNPs.....	51

Figura 15- Resposta em variação de corrente para o efeito do número de ciclos voltamétricos na eletropolimerização do monômero o-PD numa concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ácido láctico numa concentração de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	53
Figura 16- Resposta em variação de corrente para o efeito do valor do pH da solução utilizada como meio para a eletropolimerização do monômero o-PD numa concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ácido láctico numa concentração de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando 25 ciclos voltamétricos consecutivos.....	54
Figura 17- Resposta em variação de corrente para o efeito da razão molar entre ácido láctico (molécula molde) e o-PD (monômero) na eletropolimerização, para uma concentração do monômero de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando 25 ciclos voltamétricos consecutivos, em tampão PBS pH 5,0.....	56
Figura 18- Resposta em variação de corrente para o efeito do tempo de extração da molécula molde para o sensor impresso GCE-RGO-AuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-AuNPs-NIP.....	57
Figura 19- Influência do tempo de religação do ácido láctico, numa concentração de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, na resposta em variação de corrente do sensor impresso GCE-RGO-AuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-AuNPs-NIP.....	59
Figura 20- Influência do pH do meio na resposta em variação de corrente para o sensor impresso GCE-RGO-AuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-AuNPs-NIP.....	60
Figura 21- Imagens AFM para: (a) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a polimerização, (b) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a remoção, (c) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a religação e (d) GCE-RGO-AuNPs-NIP.....	61
Figura 22- Curva analítica para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP obtida em solução com diferentes concentrações de ácido láctico, em tampão PBS pH 6,0 para a religação, com tempo de remoção de 60 segundos e tempo de religação de 10 minutos. Figura interna superior: primeira região linear do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP para um intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido láctico. Figura interna inferior: voltamogramas DPV para o ácido láctico no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	62
Figura 23- Isoterma de adsorção para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP. Figura interna: curva linearizada para a adsorção do ácido láctico.....	65
Figura 24- Estudo de interferentes para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP.....	66
Figura 25- Curva de adição de padrão para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP.....	69
Figura 26- Voltamogramas cíclicos para a modificação do eletrodo GCE com RGO num intervalo de potenciais de -1,6 V a -0,20 V em solução des aerada de Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	72

Figura 27- Ilustração do processo de redução do óxido de grafeno (GO) para óxido de grafeno reduzido (RGO) em superfície de carbono vítreo após sucessivos ciclos voltamétricos.....	73
Figura 28- Voltamogramas cíclicos para a oxidação das nanopartículas de cobre na superfície do eletrodo GCE-RGO em solução de NaOH 0,10 mol L ⁻¹ com velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	74
Figura 29- Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização do monômero IAA 6,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ no eletrodo modificado GCE-RGO-CuNPs na presença de ácido málico 2,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em tampão PBS 0,10 mol L ⁻¹ (pH 6,0).....	75
Figura 30- Mecanismo para a eletropolimerização do monômero IAA.....	76
Figura 31- Voltamogramas para a remoção da molécula molde da matriz polimérica de IAA, obtidos em meio NaOH 0,10 mol L ⁻¹ numa velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	78
Figura 32- Esquema de impressão molecular para o ácido málico.....	78
Figura 33- Voltamogramas cíclicos numa velocidade 50 mV s ⁻¹ para: (a) GCE, (b) GCE-RGO e (c) GCE-RGO-CuNPs utilizando uma solução [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} numa concentração 5,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , em KCl 0,10 mol L ⁻¹	79
Figura 34- Gráficos de Nyquist para: (a) GCE, (b) GCE-RGO e (c) GCE-RGO-CuNPs numa solução de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} numa concentração 5,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ para um intervalo de frequência de 1,0 x 10 ⁵ a 5,0 x 10 ³ Hz, com amplitude “rms” de 10 mV. Figura interna: ajuste do circuito elétrico equivalente para os resultados obtidos.....	80
Figura 35- Voltamogramas cíclicos numa velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ para: (a) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a polimerização, (b) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a remoção da molécula molde, (c) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a religação de ácido málico e (d) GCE-RGO-CuNPs-NIP, utilizando uma solução de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em KCl 0,10 mol L ⁻¹	82
Figura 36- Gráficos de Nyquist para: (a) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a polimerização, (b) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a remoção da molécula molde, (c) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a religação do ácido málico, numa solução de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} concentração 5,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , para um intervalo de frequência de 1,0 x 10 ⁴ a 5,0 x 10 ³ Hz, com uma amplitude “rms” de 10 mV. Figura interna: Circuito elétrico equivalente para os resultados obtidos nas etapas de polimerização do monômero IAA e religação (curvas a e c), gráfico de Nyquist ampliado para a resposta do sensor após a etapa de remoção (curva b), com seu circuito elétrico equivalente.....	84
Figura 37- Voltamogramas cíclicos para o sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP após a remoção da molécula molde, utilizando uma solução de 5,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} em KCl 0,10 mol L ⁻¹ em diferentes velocidades de varredura. Inserção: relação entre as correntes de pico anódica e catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura.....	85

- Figura 38-** Imagens MEV-FEG para: (a) GCE-RGO, (b) GCE-RGO-CuNPs, (c) GCE-RGO-CuNPs-MIP, (d) GCE-RGO-CuNPs-NIP e (e) Espectro EDX para GCE-RGO-CuNPs.....86
- Figura 39-** Resposta em ΔI para o efeito do número de ciclos voltamétricos na eletropolimerização de IAA numa concentração de $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ácido málico $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 88
- Figura 40-** Resposta para o efeito da variação de pH da solução utilizada como meio para a eletropolimerização do monômero IAA numa concentração $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido málico, utilizando tampão PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ 90
- Figura 41-** Resposta em variação de corrente para o efeito da razão molar entre o monômero IAA e ácido málico (molécula molde) no processo de eletropolimerização, para uma concentração de $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de IAA em tampão PBS com pH 6,0.....91
- Figura 42-** Influência do número de ciclos voltamétricos aplicados na etapa de extração da molécula molde na resposta em variação de corrente para o sensor impresso GCE-RGO-CuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-CuNPs-NIP.....93
- Figura 43-** Influência do tempo de religação do ácido málico, numa concentração de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, na resposta em variação de corrente para o sensor impresso GCE-RGO-CuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-CuNPs-NIP.....94
- Figura 44-** Imagens AFM para: (a) GCE-RGO-CuNPs-MIP, (b) GCE-RGO-CuNPs-MIP remoção, (c) GCE-RGO-CuNPs-MIP religação e (d) GCE-RGO-CuNPs-NIP.....95
- Figura 45-** Curva analítica para o sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP obtida após sucessivas adições de ácido málico, após 15 minutos de contato. Figura interna superior: primeira região linear do sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP para o intervalo de concentrações de ácido málico de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Figura interna inferior: voltamogramas DPV para a oxidação da sonda após adições sucessivas de ácido málico no intervalo de concentrações de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ 97
- Figura 46-** Isoterma de ligação para o eletrodo GCE-RGO-CuNPs-MIP após a religação de diferentes concentrações de ácido málico: Figura interna: curva linearizada para a adsorção de ácido málico no MIP.....99
- Figura 47-** Estudo de interferentes para o sensor impresso GCE-RGO-CuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-CuNPs-NIP, resposta em variação de corrente após a religação com uma solução de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de: ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, glicose e glicerol.....101
- Figura 48-** Curva de adição de padrão para a determinação de ácido málico em amostras de vinhaça de cana de açúcar.....103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação entre os sensores disponíveis na literatura para a determinação de ácido láctico com o método desenvolvido no presente trabalho.....	63
Tabela 2- Parâmetros de seletividade para o GCE-RGO-AuNPs-MIP e GCE-RGO-AuNPs-NIP.....	68
Tabela 3- Estudos de recuperação para o ácido láctico em vinhaça de cana de açúcar.....	70
Tabela 4- Comparação entre os sensores disponíveis na literatura para a determinação de ácido málico com o método desenvolvido no presente trabalho.....	98
Tabela 5- Parâmetros de seletividade para o GCE-RGO-CuNPs-MIP e GCE-RGO-CuNPs-NIP.....	102
Tabela 6- Ensaios de recuperação para ácido málico em amostras de vinhaça de cana de açúcar.....	104

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Vinhaça da cana de açúcar	18
1.2	Ácidos orgânicos	20
1.2.1	Ácido láctico	20
1.2.2	Ácido málico	21
1.3	Métodos para a determinação de ácidos orgânicos	22
1.3	Sensores Eletroquímicos	23
1.4	Polímeros Molecularmente Impressos	24
1.4	Nanopartículas metálicas	26
1.5	Óxido de grafeno reduzido	28
1.6	Monômeros funcionais	30
1.7	Sinal analítico em sensores eletroquímicos baseados em MIP	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	PARTE EXPERIMENTAL	33
3.1	Instrumentação	33
3.2	Reagentes e soluções	33
3.3	Limpeza do eletrodo GCE	34
3.4	Modificação do eletrodo com óxido de grafeno reduzido	34
3.4.1	Sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP	34
3.4.2	Sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP	34
3.4.3	Preparo óxido de grafeno	34
3.4.4	Eletrodeposição do óxido de grafeno reduzido	35
3.5	Modificação do eletrodo com nanopartículas de ouro	36
3.6	Modificação do eletrodo com nanopartículas de cobre	36
3.7	Modificação do eletrodo com polímeros molecularmente impressos	36
3.7.1	Sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP	36
3.7.2	Sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP	37
3.8	Caracterização do eletrodo modificado	37
3.9	Determinação dos ácidos em vinhaça de cana de açúcar	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Preparação do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP	39
4.1.1	Eletropolimerização do monômero o-PD	39

4.1.2	Caracterização do eletrodo GCE-RGO-AuNPs-MIP	42
4.1.2.1	Caracterização eletroquímica	42
4.1.2.2	Caracterização morfológica.....	49
4.1.3	Estudo dos parâmetros para a construção do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP	50
4.1.3.1	Efeito do número de ciclos voltamétricos aplicados para a eletropolimerização.....	51
4.1.3.2	Influência do pH do meio no processo de eletropolimerização da o-PD	52
4.1.3.3	Efeito da razão molar entre ácido lático e o-PD.....	53
4.1.3.4	Efeito do tempo de extração da molécula molde.....	55
4.1.3.5	Influência do tempo de religação	57
4.1.3.6	Efeito do pH do meio no processo de religação	58
4.1.4	Caracterização morfológica da superfície do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP	59
4.1.5	Performance analítica do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP	60
4.1.6	Estudos de isoterma de adsorção.....	63
4.1.7	Estudo de interferentes	64
4.1.8	Determinação de ácido lático em vinhaça de cana de açúcar.....	66
4.1.9	Validação do método analítico desenvolvido.....	68
4.1.10	Conclusões parciais	69
4.2	Sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP.....	71
4.2.1	Preparação do sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP	71
4.2.1.1	Eletrodeposição Óxido de Grafeno Reduzido	71
4.2.1.2	Eletrodeposição CuNPs.....	72
4.2.1.3	Eletropolimerização do monômero IAA	74
4.2.2	Caracterização do eletrodo GCE-RGO-CuNPs-MIP	78
4.2.2.1	Caracterização eletroquímica	78
4.2.2.2	Caracterização morfológica.....	85
4.2.3	Estudo e otimização dos parâmetros que influenciam o desempenho do MIP	86
4.2.3.1	Efeito do número de ciclos voltamétricos para a eletropolimerização.....	87
4.2.3.2	Influência do pH do meio no processo de eletropolimerização	88
4.2.3.3	Efeito da razão molar entre IAA e ácido málico	89
4.2.3.4	Efeito do número de ciclos voltamétricos para a remoção da molécula molde	90
4.2.3.5	Influência do tempo de religação	92
4.2.4	Caracterização morfológica da superfície do sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP	93
4.2.5	Desempenho analítico do sensor GCE-RGO-CuNPs.....	94
4.2.6	Estudos de isoterma de adsorção.....	97
4.2.7	Estudo de interferentes	98

4.2.8	Determinação de ácido málico em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar	100
4.2.9	Validação do método analítico desenvolvido.....	102
4.2.10	Conclusões parciais	103
5	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vinhaça da cana de açúcar

A vinhaça é um dos principais resíduos da indústria sucroalcooleira, obtida durante a produção do etanol, na etapa de destilação numa proporção que varia de aproximadamente 10 a 14 litros para cada litro de etanol produzido, dependendo principalmente das condições tecnológicas da destilaria e da composição do mosto [1,2].

Fisicamente este resíduo apresenta-se como uma solução de coloração marrom escura, com odor forte, desagradável e bem característico [2,3]. Estima-se que para cada tonelada de cana de açúcar processada na indústria sucroalcooleira sejam obtidos aproximadamente 800 litros de vinhaça na forma de resíduo.

A vinhaça tem demonstrado uma elevada capacidade corrosiva, sendo um resíduo de comportamento essencialmente ácido, com valores de pH entre 3,5 e 5,0, apresentando também valores elevados de demanda química de oxigênio (DQO), com variações da ordem de 150 a 200 g.L⁻¹, decorrentes da grande carga de matéria orgânica presente [4–6].

Tais características colocam a vinhaça como um resíduo com grande capacidade poluidora, aproximadamente 100 vezes maior que a capacidade poluidora do esgoto doméstico, sendo por tudo isso considerado um resíduo altamente nocivo à fauna e flora em geral [2,4].

No entanto, no Brasil, ainda nos dias atuais a grande maioria de toda carga de vinhaça obtida anualmente é empregada como fertilizante, diretamente no solo dos próprios canaviais, sendo aplicado para tal um volume de aproximadamente 400 m³ de vinhaça por hectare de área plantada.

Essa prática é bastante comum porque este resíduo apresenta em sua composição concentrações consideráveis de potássio, compostos nitrogenados e compostos fosforados [3,4], o que pode fornecer uma melhora significativa na fertilidade do solo, aumentando assim a produtividade da área plantada e também representando uma boa economia com fertilizantes.

Por outro lado, tal procedimento não está sujeito a nenhum controle ambiental mais rígido e nos últimos anos pesquisas têm demonstrado que quando esta prática é realizada por

longos períodos de maneira desordenada, aumentando a carga de vinhaça adicionada no solo, pode provocar uma série de prejuízos ambientais, como várias mudanças nas características físicas e químicas do solo, o que pode levar em casos extremos à desertificação e/ou salinização [2,5].

Além disso, a utilização de vinhaça como fertilizante também pode levar à contaminação de rios e corpos d'água, poluição de lençóis freáticos, pois aumenta a capacidade de lixiviação de íons, além de liberar gases causadores do efeito estufa, como o óxido nitroso (N_2O), o qual é aproximadamente 300 vezes mais poluidor que o dióxido de carbono (CO_2) [7].

A produção estimada de etanol no Brasil para a safra 2018/2019 é de aproximadamente 33 bilhões de litros, a qual corresponde a um novo recorde para o setor, assim será gerado um volume de aproximadamente 400 bilhões de litros de vinhaça na forma de resíduo [8].

Nesse contexto fica clara a necessidade de um destino alternativo adequado para a grande carga de vinhaça obtida anualmente na indústria sucroalcooleira do Brasil. Algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas neste sentido, com o intuito de tornar o processo de obtenção do etanol mais sustentável/competitivo do ponto de vista econômico e ambiental.

Levando em consideração a elevada concentração de matéria orgânica presente, pesquisas têm demonstrado que alguns dos destinos alternativos promissores para a aplicação deste resíduo podem ser a digestão aeróbica e anaeróbica para a produção de biogás e outros produtos de interesse [7,9,10] sua utilização em outros processos de fermentação [11,12], para a obtenção de biocombustíveis de segunda geração e outros produtos de elevado valor e a sua utilização como fonte de proteína para alimentação animal [13].

Outro destino alternativo que tem chamado bastante atenção nos últimos anos é a possibilidade de recuperação e utilização dos compostos de interesse presentes neste resíduo aplicando o conceito de biorrefinaria, a qual pode possibilitar a recuperação das substâncias presentes na vinhaça na forma de produtos químicos de elevado interesse, permitindo assim um melhor aproveitamento da grande carga de biomassa disponível neste resíduo obtido anualmente em larga escala [14,15].

Nesse sentido, nos últimos anos estudos à cerca da composição da vinhaça de cana de açúcar vêm sendo realizados com o intuito de identificar e determinar seus componentes mais

importantes, confirmando que a fração orgânica deste resíduo é formada por compostos de elevado interesse tecnológicos e valor comercial, tais como: ácidos orgânicos, carboidratos, proteínas, aminoácidos, polióis, glicerol, compostos fenólicos e álcoois, além desses compostos a vinhaça ainda apresenta uma concentração apreciável de cátions inorgânicos como Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^{+} [16–18].

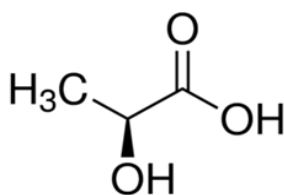
1.2 Ácidos orgânicos

A composição da vinhaça pode se alterar com a variedade de cana de açúcar cultivada, época da colheita e processos de destilação empregados nas usinas, no entanto, os ácidos orgânicos sempre estarão presentes neste resíduo, visto que a literatura tem demonstrado ao longo do tempo que esses compostos são alguns dos principais subprodutos da fermentação microbiana de açúcares empregada na produção de etanol [18,19].

1.2.1 Ácido láctico

Dentre os ácidos orgânicos encontrados na vinhaça um dos mais importantes do ponto de vista industrial e tecnológico é o ácido láctico, ácido 2-hidróxiopropanóico segundo a IUPAC, o qual é um composto solúvel em água, de função mista (ácido carboxílico e álcool), com fórmula química $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$, encontrado no leite, de onde deriva seu nome (“láctico” vem do latim *lactis*, que significa leite). A Figura 1 mostra uma representação da molécula de ácido láctico.

Figura 1- Estrutura da molécula de ácido láctico



Fonte: elaborado pelo autor

O ácido láctico é muito utilizado pela indústria de alimentos e de bebidas na produção de carnes curadas, cervejas, fermentos químicos, iogurte, sorvete, maionese, refrigerantes, queijos, sucos artificiais, produtos marinados, e conservas vegetais [20].

Apresenta uma marcante propriedade umectante, a qual pode proporcionar à pele uma maior retenção de água, sendo por isso largamente utilizado também na indústria de

cosméticos na produção de hidratantes, o ácido láctico também é utilizado em formulações que atuam como clareadores e rejuvenescedores de pele[21].

Na medicina esse ácido é utilizado na produção de antisséptico, por conta do seu poder de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, utilizado no tratamento de problemas de pele, pois pode permitir um aumento na elasticidade das fibras, podendo também ser aplicado na obtenção de material para suturas [21].

Outra importante aplicação do ácido láctico é sua utilização como matéria prima na área da biotecnologia para a obtenção de polímeros termoestáveis e biodegradáveis, os quais são alternativas atraentes e urgentes aos plásticos derivados do petróleo o que pode refletir numa grande demanda para este ácido no futuro [22].

1.2.2 Ácido málico

Ácido málico é outro importante ácido orgânico encontrado na vinhaça de cana de açúcar, o qual é um composto também solúvel em água, com fórmula química de $C_4H_6O_5$. Seu nome oficial segundo a IUPAC é ácido hidroxibutenodioico, um diácido encontrado naturalmente em muitas frutas, principalmente nas maçãs, das quais deriva seu nome (“málico” vem do latim *malum*, que significa maçã).

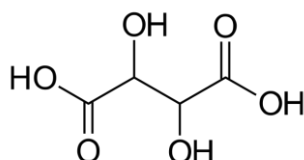
Muitas vezes é ingerido na forma de suplemento, especialmente para o tratamento da chamada síndrome de fadiga crônica, esse ácido é reconhecido por sua capacidade de aumentar a energia corporal e a tolerância ao exercício, isso por que é um componente essencial do chamado ciclo de Krebs, que converte alimento em energia no organismo.

O ácido málico tem sido aplicado com sucesso na medicina e na indústria farmacêutica, demonstrando fornecer muitos benefícios à saúde humana, é utilizado em tratamentos de ferimentos atuando como higienizador e regenerador tecidual, ao lado do magnésio tem papel fundamental no tratamento da fibromialgia. Além disso, pesquisas têm demonstrado que doses controladas desse ácido podem fornecer um aumento da imunidade, melhora da saúde bucal e prevenir o acúmulo de metais tóxicos no organismo [23].

Tem participação importante na indústria de cosméticos, onde tem papel de destaque em formulações que prometem uma pele mais firme e lisa, é uma das principais fontes naturais dos chamados alfa-hidroácidos, substâncias muito utilizadas na famosa técnica de *peeling*, sendo aplicado também na produção de creme dental.

Na indústria de alimentos é utilizado como flavorizante, realçando o sabor de muitos alimentos e mascarando sabores indesejáveis fornecidos por outros ingredientes, sendo especialmente utilizados em refrigerantes *diet*, sucos e outras bebidas adoçadas artificialmente [24]. A Figura 2 mostra a estrutura da molécula de ácido málico.

Figura 2- Estrutura da molécula de ácido málico



Fonte: elaborado pelo autor

1.3 Métodos para a determinação de ácidos orgânicos

Alguns métodos analíticos baseados em métodos para a determinação de açúcares, amplamente relatados na literatura, têm sido adaptados para a determinação de ácidos orgânicos nas mais diversas matrizes. Os principais são baseados em cromatografia gasosa (GC), eletroforese capilar (EC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- do inglês “high performance liquid chromatography”).

Embora essas técnicas sejam reconhecidamente bem sucedidas para a detecção e determinação de ácidos orgânicos, elas frequentemente podem apresentar algumas deficiências que tendem a dificultar a determinação desses compostos.

Para a análise de ácidos orgânicos por EC, a detecção fotométrica indireta ou a derivatização de amostras podem ser necessárias em muitos casos e isso tende a tornar o método mais complicado [25–28]. As principais desvantagens do uso da técnica de HPLC para a determinação de ácidos orgânicos incluem a exigência de grandes volumes de solventes (os quais podem ser tóxicos), seu alto custo e a necessidade de empregar profissionais bem treinados para operar o equipamento [28].

A determinação de ácidos orgânicos utilizando análises de GC exige um preparo de amostra apropriado e trabalhoso incluindo limpeza e / ou derivatização da amostra, isto porque, em geral, os ácidos orgânicos exibem baixa volatilidade, forte polaridade e elevada solubilidade em água [29].

Nesse contexto, levando em consideração a ampla gama de possibilidades para a aplicação desses dois importantes ácidos orgânicos encontrados na vinhaça de cana de açúcar, é de extrema importância o desenvolvimento de novos métodos analíticos alternativos que permitam suas determinações com confiabilidade, simplicidade, rapidez e baixo custo neste resíduo.

1.3 Sensores Eletroquímicos

Nos últimos anos os chamados métodos eletroquímicos têm se colocado como opções atraentes, frente aos métodos analíticos tradicionalmente aplicados para a determinação de ácidos orgânicos.

A aplicação de sensores eletroquímicos tem permitido a determinação das mais diferentes espécies químicas nas mais diversas áreas de interesse com baixos limites de detecção e quantificação, simplicidade, rapidez, boa sensibilidade[30,31].

Além disso, esses dispositivos permitem uma análise direta (sem necessidade de pré tratamento da amostra) e a possibilidade de miniaturização, tornando possível a realização da análise em campo e em tempo real, têm demonstrado também baixo custo quando comparado com outros métodos analíticos tradicionais [31].

A maioria dos sensores eletroquímicos opera no modo amperométrico, ou seja, baseados na geração de corrente em resposta ao comportamento redox da espécie química de interesse na superfície do eletrodo, nesse sentido a característica operacional desses dispositivos é a transferência de elétrons a partir ou para a molécula de interesse [32].

No entanto, apesar de toda a versatilidade desses dispositivos, algumas limitações podem levar a um baixo desempenho analítico, dentre estas, as principais são a passivação gradual da superfície do eletrodo e elevada corrente de fundo [33].

Uma estratégia para superar essas dificuldades pode ser a utilização de eletrodos modificados, os chamados eletrodos quimicamente modificados (EQM) termo inicialmente proposto por Murray em 1975. Tais dispositivos são obtidos pela imobilização de espécies químicas condutoras ou semicondutoras na superfície do eletrodo, as quais modificam as propriedades químicas, eletroquímicas, ópticas, de transporte de massa e elétricas nessa superfície [34,35].

Os materiais utilizados na construção dos EQM são capazes de diminuir o envenenamento da superfície do eletrodo, melhorar a sensibilidade, podem oferecer também atividade eletrocatalítica e uma melhora na seletividade [35,36].

Também podem fornecer um aumento efetivo da área eletroativa do eletrodo, uma vez que a maioria dos materiais utilizados na modificação apresenta uma estrutura tridimensional permitindo que as espécies químicas de interesse alcancem com mais facilidade os centros catalíticos, facilitando assim a transferência eletrônica e em consequência melhorando a resposta para o eletrodo [35].

Um dos principais requisitos para a construção de novos sensores eletroquímicos é obtenção de dispositivos cada vez mais seletivos, ou seja, capazes de realizar um reconhecimento específico de uma molécula de interesse frente a outras moléculas com estruturas e comportamentos químicos semelhantes (determinações em matrizes complexas).

No caso de sensores eletroquímicos, quando se trabalha em matrizes complexas podem existir moléculas eletroativas na mesma faixa de potencial do analito, dificultando assim a determinação.

Nos últimos anos, uma opção que tem demonstrado ser bastante atraente é a utilização dos chamados polímeros molecularmente impressos (MIPs) para a obtenção de EQMs na construção de sensores eletroquímicos, o que tem permitido a obtenção de dispositivos com seletividade consideravelmente superior.

1.4 Polímeros Molecularmente Impressos

Os chamados MIPs têm recebido cada vez mais destaque de toda a comunidade científica nos últimos anos, isso porque a aplicação desses materiais na construção de sensores eletroquímicos pode oferecer uma série de vantagens, principalmente uma melhora significativa na seletividade desses dispositivos, além disso, têm demonstrado também uma elevada estabilidade química, mecânica e térmica, facilidade no preparo, baixo custo dos reagentes e possibilidade de estocagem por longos períodos sem perda de sinal analítico [37,38].

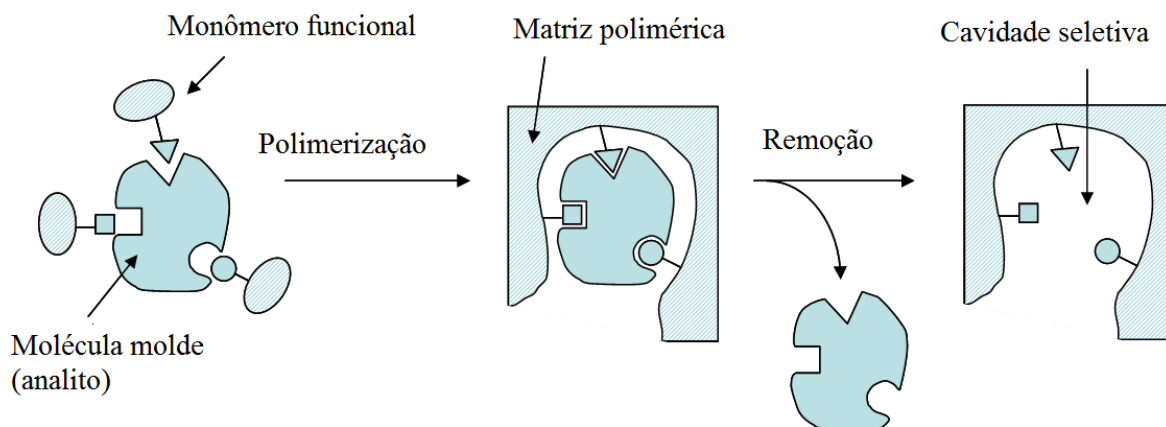
Os MIPs são receptores artificiais biomiméticos, ou seja, materiais sintéticos dotados de sítios específicos de reconhecimento para uma molécula de interesse, os quais mimetizam

interações altamente seletivas observadas em sistemas biológicos como antígeno/anticorpo, enzima/substrato ou fármaco/receptor [39].

Esses materiais são obtidos a partir de reações tradicionais de polimerização de um monômero funcional adequado na presença de uma molécula molde (geralmente o analito). Após a polimerização, a molécula molde é removida da matriz polimérica deixando uma espécie de “memória molecular” na mesma, ou seja, uma cavidade estereoquimicamente moldada e com grupos químicos posicionados estrategicamente que permitem um processo específico de religação para o analito na etapa de reconhecimento [40]. O esquema geral para a construção de um MIP é apresentado na Figura 3.

Para a aplicação em sensores eletroquímicos, os MIPs geralmente são obtidos diretamente na superfície do eletrodo. Para a deposição do polímero, a eletropolimerização tem demonstrado ser o procedimento mais indicado, fornecendo os melhores resultados, esta etapa é realizada geralmente utilizando a técnica de Voltametria Cíclica.

Figura 3- Esquema geral para o preparo de MIP



Fonte: Adaptado [41]

A eletropolimerização permite o controle da espessura e morfologia do filme polimérico depositado na superfície do eletrodo, controlando alguns parâmetros experimentais como número de ciclos voltamétricos e intervalo de potencial aplicado, além de permitir uma melhor adesão do polímero obtido, trabalhar em solução aquosa e apresentar uma elevada reprodutibilidade [42].

Após a etapa de polimerização é realizada a remoção da molécula molde do interior da matriz polimérica obtida na superfície do eletrodo, para a obtenção das cavidades seletivas de reconhecimento, esse procedimento geralmente pode ser realizado de duas maneiras diferentes, com auxílio de um solvente orgânico ou eletroquimicamente utilizando o chamado processo de “superoxidação” (do inglês “overoxidation”).

No primeiro caso a extração é realizada sob agitação branda e tem como base a capacidade de interação do solvente com a molécula molde e a matriz polimérica, nesse sentido o solvente selecionado inicialmente atua provocando o “inchaço” do polímero, o que facilita o processo de enfraquecimento ou ruptura das interações estabelecidas na etapa de impressão molecular, entre os grupos funcionais da molécula molde e os grupos funcionais do polímero, permitindo assim a saída da molécula molde e a criação da cavidade seletiva de reconhecimento sem causar danos à estrutura física do polímero [43].

Na “superoxidação” o eletrodo modificado com MIP é submetido a elevados potenciais na presença de nucleófilos fortes (como OH^-), o que provoca um processo de oxidação irreversível no polímero e permite a saída da molécula molde para a obtenção da cavidade seletiva, além disso, esse processo também promove a inserção de grupos oxigenados na matriz polimérica, o que pode melhorar a condutividade do polímero [44].

1.4 Nanopartículas metálicas

Em geral sensores eletroquímicos baseados em MIP como elemento de reconhecimento podem sofrer com uma baixa condutividade, podendo levar a uma baixa sensibilidade para o eletrodo, isso pode acontecer devido à matriz polimérica formada na superfície do eletrodo, a qual nem sempre é condutora.

Em macroeletrodos planares, a construção do MIP ainda pode enfrentar outros obstáculos, merecendo destaque para a aglomeração das cavidades seletivas na matriz polimérica, ocasionando assim uma mobilidade restrita no interior do polímero, comprometendo a resposta (seletividade) do sensor devido à difícil acessibilidade aos sítios seletivos impressos.

Com o intuito de superar tais dificuldades os MIPs têm sido construídos principalmente sobre superfícies de eletrodos modificados com nanomateriais de carbono e nanopartículas metálicas.

As nanopartículas metálicas vêm recebendo cada vez mais destaque na área de eletroanalítica para a construção de sensores eletroquímicos, principalmente por conta das propriedades químicas e físicas não usuais desses materiais, as quais contribuem de maneira significativa para um aumento da resposta analítica do sensor desenvolvido.

Dependendo principalmente do seu tamanho e forma a aplicação de nanopartículas metálicas na modificação de eletrodos fornece quatro marcantes vantagens quando comparado com macroeletrodos não modificados: aumento do transporte de massa, aumento da área superficial efetiva, controle do microambiente do eletrodo e eletrocatalise [45,46].

A construção do MIP sobre superfícies nanoestruturadas também tem demonstrado ser um caminho promissor para superar problemas observados em macroeletrodos planares, visto que além de suas propriedades usuais, esses nanomateriais também podem oferecer um número maior de locais para a impressão molecular, influenciando assim no número e uniformidade de sítios seletivos de reconhecimento obtidos na superfície do eletrodo.

Quando comparadas com as superfícies planares, as superfícies nanoestruturadas podem oferecer um aumento de até 15 vezes no número de locais disponíveis para a eletropolimerização [47].

Dentre as nanopartículas metálicas mais utilizadas na construção de sensores eletroquímicos merece destaque as nanopartículas de ouro (AuNPs) e nanopartículas de cobre (CuNPs), com o cobre na sua forma de óxido, principalmente por conta de seus baixos custos, baixas toxicidades e excelente atividade catalítica para a oxidação de uma série de compostos de interesse oferecidas por esses nanomateriais [48].

As AuNPs são caracterizadas por apresentarem propriedades que incluem, eficiência na condução elétrica, excelentes propriedades ópticas, excelente compatibilidade com diversos materiais, inclusive os materiais utilizados para a construção de macroeletrodos e elevada compatibilidade para a imobilização de grande variedade moléculas na sua superfície, o que incluem as moléculas utilizadas como monômero para a construção de MIPs, essas características fez crescer nos últimos anos a aplicação desses materiais na construção de biossensores e sensores [49,50].

Nanopartículas de óxidos de cobre (CuNPs) por sua vez são materiais que apresentam um pequeno “band gap” e têm sido utilizados com sucesso na construção de sensores

eletroquímicos, dispositivos ópticos e fotovoltaicos por conta de suas propriedades elétricas superiores. Para a aplicação em MIP essas nanopartículas ainda podem proporcionar um aumento no número de sítios seletivos impressos durante a etapa de polimerização [48,51].

Um desafio para a utilização desses materiais na construção de sensores é a etapa de deposição na superfície do eletrodo, neste trabalho será utilizada a técnica de eletrodeposição, a qual tem sido uma das técnicas mais empregadas por conta de sua simplicidade, baixo custo e possibilitar um maior controle do processo de nucleação e crescimento das nanopartículas na superfície do eletrodo.

1.5 Óxido de grafeno reduzido

O grafeno, de acordo com a IUPAC, é um material constituído por monocamadas de átomos de carbono conectados por ligações químicas do tipo sp^2 , formando ligações σ com outros três átomos de carbono distribuídos numa rede hexagonal com uma extensa nuvem eletrônica formada de elétrons π conjugados.

Há algum tempo, materiais à base de grafeno têm atraído à atenção de muitos pesquisadores por conta de algumas de suas propriedades superiores, como elevada área superficial e condutividade elétrica, estabilidade química, resistência mecânica e possibilidade de servir como substrato para outras deposições [52,53].

Devido a algumas dessas características, materiais à base de grafeno têm demonstrado habilidade para realizar reações de transferência eletrônica com sucesso na superfície de eletrodos, melhorando o processo quando comparado com eletrodos não modificados, o que permite coloca-los como uma alternativa muito atraente para a modificação de eletrodos na construção de sensores eletroquímicos [52].

No entanto, a difícil manipulação e transferência das nanofolhas de grafeno para a superfície de eletrodos, devido principalmente à sua baixa solubilidade em meio aquoso pode restringir seu uso como modificador em sensores eletroquímicos.

Essa situação tem levado à busca por novas alternativas para a utilização desse material na área, a modificação da composição química das nanofolhas de grafeno por meio da inserção de grupos químicos que podem melhorar seu comportamento em solução aquosa bem como sua interação com materiais condutores de eletrodos têm demonstrado excelentes

resultados, principalmente com a oxidação das nanofolhas para a obtenção do chamado óxido de grafeno (GO).

O GO é um nanomaterial que apresenta fácil dispersão em água, o que facilita o seu manuseio e conseqüentemente sua transferência para a superfície de eletrodos. Sua produção passa pela oxidação das laminas de grafite (grafeno), processo que introduz em sua estrutura grupos oxigenados (epóxi, hidroxila, carboxílicos e carbonila) intercalados entre as folhas de átomos de carbono, mudando a hibridação desses átomos de sp^2 para sp^3 e promovendo aumento da distância interplanar das folhas de grafeno [54].

A introdução desses grupos funcionais oxigenados ao grafeno torna o GO uma material mais fácil de manipular e fácil de realizar funcionalização, além disso, o GO assim como o grafeno, apresenta elevada área superficial, a qual pode ser utilizada para a funcionalização com uma série de materiais como, por exemplo, as nanopartículas metálicas.

No entanto, embora a solubilidade do GO melhore em relação ao grafeno com a inserção dos grupos oxigenados na sua estrutura, o que o torna um material interessante para modificação de eletrodos, esses grupos também tornam o GO um isolante elétrico.

Diferentemente do grafeno, que possui somente carbonos sp^2 conjugados em sua estrutura, o GO possui defeitos causados pela inserção dos grupos funcionais oxigenados, que acabam por interromper a conjugação devido ao surgimento de carbonos sp^3 , ocasionando uma diminuição da condutividade elétrica [55].

Para superar este problema, normalmente é realizada a redução do GO para óxido de grafeno reduzido (RGO), que remove em grande parte os grupos oxigenados e mantém as características vantajosas do grafeno e do GO [55] permitindo assim a sua aplicação para a construção de sensores eletroquímicos, visto que o RGO pode ao mesmo tempo servir de substrato para uma nova modificação e também melhorar o processo de transferência eletrônica, nos últimos anos vários trabalhos têm sido publicados utilizando RGO para modificar eletrodos e construção de sensores eletroquímicos [56–58].

Nesse contexto o presente trabalho propõe a construção de sensores eletroquímicos para a determinação de ácidos orgânicos baseados em MIP como elemento de reconhecimento, obtidos sobre superfícies nanoestruturadas de óxido de grafeno reduzido modificada com nanopartículas metálicas de ouro e de óxido de cobre.

Tais modificações podem oferecer um aumento significativo no número de sítios seletivos de reconhecimento para o MIP obtido e facilitar o processo de transferência eletrônica para a sonda na superfície do eletrodo, melhorando assim o sinal analítico para o sensor.

Alguns trabalhos publicados na literatura nos últimos anos têm demonstrado a aplicação de alguns métodos eletroquímicos para a determinação de ácidos orgânicos nas mais diversas matrizes. Dentre os métodos eletroquímicos relatados na literatura, os métodos baseados em biossensores amperométricos são considerados os métodos mais rápidos, simples e seletivos para o monitoramento do ácido láctico [59–62] e do ácido málico [63–65], alguns dos principais ácidos orgânicos.

No entanto, a natureza instável das enzimas (agentes de reconhecimento), que pode levar à perda de atividade das mesmas, pode ser considerada a principal dificuldade para se trabalhar com biossensor em meios de composição complexa e baixo pH como é o caso da vinhaça de cana de açúcar.

Até o presente momento apenas um artigo foi publicado na literatura mostrando a construção e aplicação de sensores eletroquímicos baseados em MIP para a determinação do ácido láctico [66].

Apesar de mostrar uma resposta rápida, o método aplicado para a produção do MIP (polimerização química e posterior imobilização física do polímero na superfície do eletrodo) pode prejudicar o desempenho analítico do sensor devido a problemas relacionados ao transporte de massa, falta de acessibilidade aos locais de impressão e aglomeração de cavidades podendo levar a uma resposta lenta.

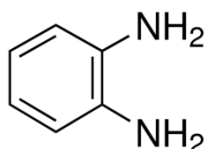
1.6 Monômeros funcionais

Dentre os monômeros funcionais empregados para a construção de sensores eletroquímicos baseados em MIP obtidos por eletropolimerização, a o-fenilenodiamina (o-PD) tem demonstrado características vantajosas, isso porque este monômero permite a obtenção de filmes finos e compactos na superfície do eletrodo, possibilitando assim uma resposta rápida para o sensor desenvolvido [42].

Além disso, o polímero obtido apresenta boa compatibilidade com materiais condutores geralmente utilizados para a construção de eletrodos e boa capacidade de interação com uma

grande variedade de moléculas, permitindo assim a construção e aplicação de MIP para uma ampla gama de analitos nas mais variadas matrizes [67,68]. A Figura 4 mostra a estrutura da molécula de o-PD.

Figura 4- Estrutura da molécula do monômero o-PD

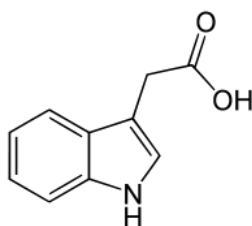


Fonte: elaborado pelo autor

Outro monômero funcional que tem recebido destaque nos últimos anos é o ácido indol acético (IAA), o qual tem demonstrado ser uma opção atraente para a construção de MIPs principalmente por conta de sua facilidade de polimerização na superfície de eletrodos, grande capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio, fácil manipulação, estabilidade mecânica e química, além de ser um polímero biodegradável [69,70].

Outra propriedade do polímero obtido a partir deste monômero é a capacidade de incorporar ânions em sua estrutura durante o processo de polimerização, aumentando ainda mais o seu campo de aplicação para a construção de MIP. A Figura 5 mostra a estrutura da molécula de IAA.

Figura 5-Estrutura da molécula de ácido indol acético



Fonte: elaborado pelo autor

1.7 Sinal analítico em sensores eletroquímicos baseados em MIP

A obtenção de sinal analítico para um sensor eletroquímico baseado em MIP pode ser realizada de duas maneiras diferentes: “no modo direto”, quando a molécula do analito é eletroativa nas condições de operação do MIP, nessa situação o sinal analítico medido é diretamente proporcional à concentração do analito que ocupará as cavidades impressas no polímero e sofrerá um processo de oxidação/redução na superfície do eletrodo[67].

Por outro lado, o sinal analítico será obtido através do chamado “modo indireto” de detecção quando for necessário utilizar uma sonda eletroquímica com comportamento redox conhecido, essa situação é observada quando o analito não apresenta atividade eletroativa satisfatória nas condições de operação do MIP [67].

Nesse caso utiliza-se um par redox como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$, assim a resposta analítica será proporcional ao sinal das moléculas da sonda que alcançarão a superfície do eletrodo por meio das cavidades não ocupadas pelo analito no MIP após a etapa de religação, de modo que a diminuição da resposta analítica para a sonda no sensor é proporcional ao aumento da concentração da espécie de interesse (analito) ligada nas cavidades do MIP.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrada a construção e aplicação de sensores eletroquímicos baseados em polímeros molecularmente impressos (MIPs) sensíveis e altamente seletivos para a determinação de ácido láctico e ácido málico, alguns dos ácidos orgânicos mais importantes encontrados na vinhaça de cana de açúcar.

Para a construção do MIP foram utilizados dois monômeros funcionais diferentes, no primeiro sensor foi utilizado a o-fenilenodiamina (o-PD) e para o segundo foi selecionado o ácido acético 3 indólico (IAA), os quais permitiram a obtenção de filmes finos e compactos na superfície do eletrodo.

Os MIPs foram construídos sobre superfície modificada com nanomateriais de carbono (óxido de grafeno reduzido) e nanopartículas metálicas, (nanopartículas de ouro e nanopartículas de cobre), a elevada área superficial e elevada condutividade elétrica oferecida por esses materiais permitiram a obtenção de sensores com baixos limites de detecção e quantificação e boa sensibilidade.

Para a determinação de ácido láctico, o sensor desenvolvido (GCE-RGO-AuNPs-MIP) apresentou um limite de detecção de $8,9 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$, numa ampla faixa linear de trabalho. O eletrodo foi aplicado com sucesso para a determinação do ácido láctico em amostras de vinhaça de cana de açúcar, sendo determinada uma concentração de $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para este ácido, com excelentes resultados para a seletividade frente a outras moléculas com tamanho e estruturas semelhantes presentes neste resíduo, fator importante quando se trabalha em matrizes complexas.

Para a determinação do ácido málico, o sensor desenvolvido (GCGE-RGO-CuNPs-MIP) apresentou um limite de detecção de $6,6 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$, apresentando resposta linear numa ampla faixa de concentrações. O eletrodo desenvolvido foi aplicado com sucesso para a determinação do ácido málico em amostras de vinhaça de cana de açúcar, sendo determinada uma concentração de $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ deste ácido, com bons resultados para a seletividade frente aos interferentes presentes.

Com base nos resultados obtidos, pode ser afirmado que os sensores desenvolvidos podem ser aplicados para a determinação desses compostos em vinhaça de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- [1] M.A.S. Silva, N.P. Griebeler, L.C. Borges, Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater, *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* 11 (2007) 108–114.
- [2] J. Hoarau, Y. Caro, I. Grondin, T. Petit, Sugarcane vinasse processing : Toward a status shift from waste to valuable resource . A review, *J. Water Process Eng.* 24 (2018) 11–25.
- [3] A.P.M. Silva, J.A.M. Bono, F.D.A.R. Pereira, Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar : Efeito no solo e na produtividade de colmos Fertigation with vinasse in sugarcane crop : Effect on the soil and on productivity, *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* 18 (2014) 38–43.
- [4] C.A. Christofolletti, J.P. Escher, J.E. Correia, J. Fernanda, U. Marinho, C.S. Fontanetti, Sugarcane vinasse : Environmental implications of its use, *Waste Manag.* 33 (2013) 2752–2761. doi:10.1016/j.wasman.2013.09.005.
- [5] E. Espanã, J. Mijangos-cortes, Vinasses : characterization and treatments, *Waste Manag.* (2011) 1235–1250. doi:10.1177/0734242X10387313.
- [6] R.B. Nair, M.J. Taherzadeh, Valorization of sugar-to-ethanol process waste vinasse : A novel biorefinery approach using edible ascomycetes filamentous fungi, *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 469–476. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.074.
- [7] B.S. Moraes, M. Zaiat, A. Bonomi, Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil : Challenges and perspectives, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 44 (2015) 888–903. doi:10.1016/j.rser.2015.01.023.
- [8] brasil-produz-recorde-de-etanol-na-safra-201819 @ g1.globo.com, (n.d.). <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2019/04/24/brasil-produz-recorde-de-etanol-na-safra-201819.ghtml>.
- [9] M. Parsaee, M. Kiani, D. Kiani, K. Karimi, Biomass and Bioenergy A review of biogas production from sugarcane vinasse, *Biomass and Bioenergy.* 122 (2019) 117–125. doi:10.1016/j.biombioe.2019.01.034.
- [10] L. Janke, A. Leite, M. Nikolausz, T. Schmidt, J. Liebetrau, Biogas Production from Sugarcane Waste : Assessment on Kinetic Challenges for Process Designing, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 20685–20703. doi:10.3390/ijms160920685.
- [11] E. Bittencourt, C. Larroche, A. Cristine, R. Nouaille, S. Jyoti, S. Kaur, L. Alberto, J. Letti, V. Thomaz, C. Ricardo, Bioresource Technology Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source, *Bioresour. Technol.* 159 (2014) 380–386. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.042.
- [12] B.F. Napolini, A. Carlos, D.O. Machado, W. Barreiro, C. Junior, D. Maria, G. Freire, M.C. Cammarota, Bioconversion of Sugarcane Vinasse into High-Added Value Products and Energy, *Biomed Res. Int.* 2017 (2017).

- [13] S. Nitayavardhana, K. Issarapayup, P. Pavasant, S. Kumar, Production of protein-rich fungal biomass in an airlift bioreactor using vinasse as substrate, *Bioresour. Technol.* 133 (2013) 301–306. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.073.
- [14] S.G. Karp, A.H. Igashiyama, P.F. Siqueira, J.C. Carvalho, L.P.S. Vandenberghe, V. Thomaz-soccol, J. Coral, J. Tholozan, A. Pandey, C.R. Soccol, Application of the biorefinery concept to produce L -lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale, *Biomass and Bioenergy.* 102 (2011) 1765–1772. doi:10.1016/j.biortech.2010.08.102.
- [15] K. Lappa, P. Kandyli, A. Bekatorou, N. Bastas, S. Klaoudatos, N. Athanasopoulos, M. Kanellaki, A.A. Koutinas, Continuous acidogenesis of sucrose , raffinose and vinasse using mineral kissiris as promoter, *Bioresour. Technol.* 188 (2015) 43–48. doi:10.1016/j.biortech.2015.01.131.
- [16] E. Doelsch, A. Masion, P. Cazevieuille, N. Condom, Spectroscopic characterization of organic matter of a soil and vinasse mixture during aerobic or anaerobic incubation, *Waste Manag.* 29 (2020) 1929–1935. doi:10.1016/j.wasman.2008.12.009.
- [17] M.K. Dowd, S.L. Johansen, L. Cantarella, P.J. Reilly, Low Molecular Weight Organic Composition of Ethanol Stillage from Sugarcane Molasses , Citrus Waste , and Sweet Whey, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 283–288.
- [18] M.B. Benke, A.R. Mermut, B. Chatson, Carbon-13 CP / MAS NMR and DR-FTIR spectroscopic studies of sugarcane distillery waste, *Can. J. Soil Sci.* 78 (1998) 227–236.
- [19] L. Tadeu, M. Loureiro, M. Zaiat, Seasonal characterization of sugarcane vinasse : Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion, *Sci. Total Environ.* 634 (2018) 29–40. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.326.
- [20] E. Ismail, A.M. Khaneghah, F.J. Barba, J.A. Saraiva, A.S. Sant, S. Mohammad, B. Hashemi, Recent advancements in lactic acid production - a review, *Food Res. Int.* 107 (2018) 763–770. doi:10.1016/j.foodres.2018.01.001.
- [21] F. Andres, C. Martinez, E. Marcos, M. Dom, R.P. De Souza, Lactic acid properties , applications and production : A review, *Trends Food Sci. Technol.* 30 (2013) 70–83. doi:10.1016/j.tifs.2012.11.007.
- [22] E. Castro-aguirre, F. Iñiguez-franco, H. Samsudin, X. Fang, R. Auras, Poly (lactic acid) — Mass production , processing , industrial applications , and end of life ☆, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107 (2016) 333–366. doi:10.1016/j.addr.2016.03.010.
- [23] G.E.A.M.Facn.A.J.D.F.M. MPH, Management of Fibromyalgia : Rationale for the Use of Magnesium and Malic Acid, *Journalof Nutr. Med.* 3 (1992) 49–59.
- [24] Z. Chi, Z. Wang, G. Wang, I. Khan, Z. Chi, Microbial biosynthesis and secretion of l-malic acid and its applications, *Crit. Rev. Biotechnol.* 8551 (2014) 1–9. doi:10.3109/07388551.2014.924474.
- [25] Y. Xiao, Y. Li, J. Ying, Y. Tian, Y. Xiao, Z. Mei, Determination of alditols by capillary electrophoresis with indirect laser-induced fluorescence detection, *FOOD*

- Chem. 174 (2015) 233–239. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.046.
- [26] P. Liang, M. Sun, P. He, L. Zhang, G. Chen, Determination of carbohydrates in honey and milk by capillary electrophoresis in combination with graphene – cobalt microsphere hybrid paste electrodes, *Food Chem.* 190 (2016) 64–70. doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.059.
- [27] P.G. Ergönül, C. Nergiz, Determination of Organic Acids in Olive Fruit by HPLC, *Czech J. Food Sci.* 28 (2010) 202–205.
- [28] J. Wei, Miin, Chang, Chun.; Jen, Determination of Organic Acids in Fermentation Products of Milk with High Performance Liquid Chromatography / On-lined Microdialysis, *Chromatographia.* 54 (2001) 601–605.
- [29] I. Molnar-Perl, Simultaneous quantitation of acids and sugars by chromatography : gas or high-performance liquid chromatography ?, *J. Chromatogr. A.* 845 (1999) 181–195.
- [30] N.R. Stradiotto, H. Yamanaka, M.V.B. Zanoni, Review Electrochemical Sensors : A Powerful Tool in Analytical Chemistry, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 159–173.
- [31] E. Bakker, M. Telting-Diaz, Electrochemical Sensors, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2781–2800.
- [32] E. Bakker, Y. Qin, Electrochemical Sensors, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3965–3984. doi:10.1021/ac060637m.
- [33] D. Lowinsohn, Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos, *Quim. Nova.* 29 (2006) 1318–1325.
- [34] P.R. Moses, L. Wler, R.W. Murray, Chemically Modified Tin Oxide Electrode, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1–5. doi:10.1021/ac60362a043.
- [35] R.W. Murray, A.G. Ewlng, Chemically Modified Electrodes Molecular Design for electroanalysis, *Anal. Chem.* 59 (1987).
- [36] M. de F.B. Souza, Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem, *Quim. Nova.* 20 (1997) 191–195.
- [37] M. Azevedo, J. Luiz, A. Cardoso, D. Sá, E. Buffon, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymer on nanostructured carbon materials : A review, *J. Electroanal. Chem.* 840 (2019) 343–366. doi:10.1016/j.jelechem.2019.04.005.
- [38] S.A. Piletsky, A.P.F. Turner, Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers, *Electroanalysis.* 14 (2002) 317–323.
- [39] E.C. Figueiredo, A. Cristi, B. Dias, M. Aurélio, Z. Arruda, Impressão molecular : uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos, *Rev. Bras. Ciências Farm.* 44 (2008).
- [40] K. Haupt, K. Mosbach, Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors, *Chem. ReV.* 100 (2000) 2495–2504. doi:10.1021/cr990099w.
- [41] L.T.M.B.Y.S.P. Chen, New immobilisation protocol for the template used in solid -

- phase synthesis of MIP nanoparticles †, *Appl. Surf. Sci.* (2017). doi:10.1016/j.apsusc.2017.02.105.
- [42] P.S. Sharma, A. Pietrzyk-le, Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing, *Anal Bioanal Chem.* 402 (2012) 3177–3204. doi:10.1007/s00216-011-5696-6.
- [43] M.A. Beluomini, J.L. Silva, G.C. Sedenho, N.R. Stradiotto, D -mannitol sensor based on molecularly imprinted polymer on electrode modified with reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles, *Talanta.* 165 (2017) 231–239. doi:10.1016/j.talanta.2016.12.040.
- [44] C. Zhang, Y. She, T. Li, F. Zhao, M. Jin, Y. Guo, L. Zheng, S. Wang, F. Jin, H. Shao, H. Liu, A highly selective electrochemical sensor based on molecularly imprinted polypyrrole-modified gold electrode for the determination of glyphosate in cucumber and tap water, *Anal Bioanal Chem.* 409 (2017) 7133–7144. doi:10.1007/s00216-017-0671-5.
- [45] F.W. Campbell, R.G. Compton, The use of nanoparticles in electroanalysis: An updated review, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 241–259. doi:10.1007/s00216-009-3063-7.
- [46] A. Bonanni, Y. Miyahara, Influence of gold nanoparticles size (2-50nm) upon electrochemical behavior : an electrochemical impedance spectroscopic and voltammetric study w, *Phys. Chem. Phys.* 13 (2011) 4980–4986. doi:10.1039/c0cp01209b.
- [47] R.P. and A.H. Michael J. Whitcombe, Iva Chianella, Lee Larcombe, Sergey A. Piletsky, James Noble, The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 1547–1571. doi:10.1039/c0cs00049c.
- [48] S. Yang, Y. Zheng, X. Zhang, S. Ding, L. Li, Molecularly imprinted electrochemical sensor based on the synergic effect of nanoporous gold and copper nanoparticles for the determination of cysteine, *J. Solid State Electrochem.* 20 (2016) 2037–2044. doi:10.1007/s10008-016-3213-8.
- [49] X. Luo, A. Morrin, A.J. Killard, M.R. Smyth, Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors, *Electroanalysis.* 18 (2006) 319–326. doi:10.1002/elan.200503415.
- [50] S. Guo, E. Wang, Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles, *Anal. Chim. Acta.* 598 (2007) 181–192. doi:10.1016/j.aca.2007.07.054.
- [51] B. Li, Y. Zhou, W. Wu, M. Liu, S. Mei, Y. Zhou, T. Jing, Highly selective and sensitive determination of dopamine by the novel molecularly imprinted poly (nicotinamide)/ CuO nanoparticles modified electrode, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 121–128. doi:10.1016/j.bios.2014.07.053.
- [52] Y. Shao, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I.A. Aksay, Y. Lin, Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors : A Review, *Electroanalysis.* 22 (2010) 1027–1036. doi:10.1002/elan.200900571.

- [53] A. Rochefort, J.D. Wuest, Interaction of Substituted Aromatic Compounds with Graphene, *Langmuir*. 25 (2009) 210–215.
- [54] K.R. Ratinac, W. Yang, J.J. Gooding, P. Thordarson, Graphene and Related Materials in Electrochemical Sensing, *Electroanalysis*. 23 (2011) 803–826. doi:10.1002/elan.201000545.
- [55] S. Wu, Q. He, C. Tan, Y. Wang, H. Zhang, Graphene-Based Electrochemical Sensors, *Small*. 9 (2013) 1160–1172. doi:10.1002/smll.201202896.
- [56] C. Wang, J. Du, H. Wang, C. Zou, F. Jiang, P. Yang, Y. Du, A facile electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and Au nanoplates modified glassy carbon electrode for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid Author:, *Sensors Actuators B. Chem.* (2014). doi:10.1016/j.snb.2014.07.077.
- [57] L. Chen, Y. Tang, K. Wang, C. Liu, S. Luo, Electrochemistry Communications Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode and its electrochemical application, *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 133–137. doi:10.1016/j.elecom.2010.11.033.
- [58] J. Luiz, M.A. Beluomini, G. Cristina, N.R. Stradiotto, Determination of amino acids in sugarcane vinasse by ion chromatographic using nickel nanoparticles on reduced graphene oxide modified electrode, *Microchem. J.* (2017). doi:10.1016/j.microc.2017.07.007.
- [59] M. Stre, G. Greif, E. Sturdík, A rapid method for determination of L -lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite, *FOOD Control*. 23 (2012) 238–244. doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.021.
- [60] S. Kim, K. Kim, H. Kim, H. Lee, T. Joo, Y. Min, Non-enzymatic electrochemical lactate sensing by NiO and Ni (OH) 2 electrodes : A mechanistic investigation, *Electrochim. Acta*. 276 (2018) 240–246. doi:10.1016/j.electacta.2018.04.172.
- [61] Z.H. Ibupoto, S. Muhammad, U. Ali, K. Khun, M. Willander, Electrochemical L-Lactic Acid Sensor Based on Immobilized ZnO Nanorods with Lactate Oxidase, *Sensors*. 12 (2012) 2456–2466. doi:10.3390/s120302456.
- [62] C. Sun, D. Wang, M. Zhang, Y. Ni, X. Shen, Y. Song, Z. Geng, W. Xu, F. Liu, C. Mao, Novel l-lactic acid biosensors based on conducting polypyrrole-block copolymer nanoparticles, *Analyst*. 140 (2015) 797–802. doi:10.1039/C4AN01602E.
- [63] A. Arvinte, L. Rotariu, C. Bala, Amperometric Low-Potential Detection of Malic Acid Using Single-Wall Carbon Nanotubes Based Electrodes, *Sensors*. 8 (2008) 1497–1507.
- [64] M. Arif, S.J. Setford, K.S. Burton, I.E. Tothill, C.B. Centre, L-Malic acid biosensor for field-based evaluation of apple, potato and tomato horticultural produce, *Analyst*. 127 (2002) 104–108. doi:10.1039/b106400m.
- [65] M. Esti, G. Volpe, L. Micheli, E. Delibato, D. Compagnone, D. Moscone, G. Palleschi, Electrochemical biosensors for monitoring malolactic fermentation in red wine using two strains of *Oenococcus oeni*, *J. Agric. Food Chem.* 513 (2004) 357–364. doi:10.1016/j.jafc.2003.12.011.

- [66] T. Alizadeh, S. Nayeri, S. Mirzaee, A high performance potentiometric sensor for lactic acid determination based on molecularly imprinted polymer / MWCNTs / PVC nanocomposite film covered carbon rod electrode, *Talanta*. 192 (2019) 103–111. doi:10.1016/j.talanta.2018.08.027.
- [67] J. Liu, H. Tang, B. Zhang, X. Deng, F. Zhao, P. Zuo, Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer for sensitive and selective determination of metronidazole via two different approaches, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 4287–4295. doi:10.1007/s00216-016-9520-1.
- [68] V. V Shumyantseva, T. V Bulko, L. V Sigolaeva, A. V Kuzikov, A.I. Archakov, Electrosynthesis and binding properties of molecularly imprinted poly- o - phenylenediamine for selective recognition and direct electrochemical detection of myoglobin, *Biosens. Bioelectron.* 86 (2016) 330–336. doi:10.1016/j.bios.2016.05.101.
- [69] B.B. Prasad, I. Pandey, Electrochemically imprinted molecular recognition sites on multiwalled carbon-nanotubes / pencil graphite electrode surface for enantioselective detection of d - and l -aspartic acid, *Electrochim. Acta.* 88 (2013) 24–34. doi:10.1016/j.electacta.2012.10.095.
- [70] B. Feier, A. Blidar, A. Pusta, P. Carciuc, C. Cristea, Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer for the Detection of Cefalexin, *Biosensors*. 9 (2019). doi:10.3390/bios9010031.
- [71] Q. Du, M. Zheng, L. Zhang, Y. Wang, J. Chen, L. Xue, W. Dai, G. Ji, J. Cao, *Electrochimica Acta* Preparation of functionalized graphene sheets by a low-temperature thermal exfoliation approach and their electrochemical supercapacitive behaviors, *Electrochem. Acta.* 55 (2010) 3897–3903. doi:10.1016/j.electacta.2010.01.089.
- [72] S.M. Sayyah, S.M. Kamal, R.E. Azooz, Electropolymerization of O -Phenylenediamine on Pt-Electrode from Aqueous Acidic Solution : Kinetic , Mechanism , Electrochemical Studies and Characterization of the Polymer Obtained, *J. Appl. Polym. Sci.* 112 (2009) 3695–3706. doi:10.1002/app.
- [73] X. Li, M. Huang, W. Duan, Y. Yang, Novel Multifunctional Polymers from Aromatic Diamines by Oxidative, *Chem. ReV.* 102 (2002) 2925–3030. doi:10.1021/cr010423z.
- [74] H. Li, H. Guan, H. Dai, Y. Tong, X. Zhao, W. Qi, An amperometric sensor for the determination of benzophenone in food packaging materials based on the electropolymerized molecularly imprinted poly- o -phenylenediamine film, *Talanta*. 99 (2012) 811–815. doi:10.1016/j.talanta.2012.07.033.
- [75] E.P. Randviir, C.E. Banks, Electrochemical impedance spectroscopy : an overview of bioanalytical applications, *Anal. Methods*. 5 (2013) 1098–1115. doi:10.1039/c3ay26476a.
- [76] B. Chang, S. Park, Electrochemical Impedance Spectroscopy, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 3 (2010) 207–229. doi:10.1146/annurev.anchem.012809.102211.
- [77] G. Instruments, Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy, *Apl. Note*. 9 (2010).

- [78] A.A. Ariffin, R.D. O'Neill, M.Z.A. Yahya, Z.M. Zain, Electropolymerization of ortho-phenylenediamine and its use for detection on hydrogen peroxide and ascorbic acid by electrochemical impedance spectroscopy, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012) 10154–10163.
- [79] M. Fall, A.A. Diagne, M.M. Dieng, F. Deflorian, S. Rossi, P.L. Bonora, C. Della Volpe, J.J. Aaron, Electrochemical impedance spectroscopy of poly(3-methoxythiophene) thin films in aqueous LiClO₄ solutions, *Synth. Met.* 155 (2005) 569–575. doi:10.1016/j.synthmet.2005.09.043.
- [80] Z.Y. Xiao Li, Yanfen He, Fan Zhao, Weiyang Zhang*, S, *RSC Advances*, *RSC Adv.* 5 (2015) 56534–56540. doi:10.1039/C5RA09556E.
- [81] K. Kor, K. Zarei, Development and characterization of an electrochemical sensor for furosemide detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer, *Talanta.* 146 (2016) 181–187. doi:10.1016/j.talanta.2015.08.042.
- [82] N. Karimian, M. Vagin, M. Hossein, A. Zavar, M. Chamsaz, A.P.F. Turner, A. Tiwari, *Biosensors and Bioelectronics* An ultrasensitive molecularly-imprinted human cardiac troponin sensor, *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 492–498. doi:10.1016/j.bios.2013.07.013.
- [83] L. Wen-zhi, L. You-qin, Chemical Preparation of nano-copper oxide modified glassy carbon electrode by a novel film plating / potential cycling method and its characterization, *Sensors Actuators B. Chem.* 141 (2009) 147–153. doi:10.1016/j.snb.2009.05.037.