

BRUNA GABRIELLE OLSEN PINTO

**Sensor eletroquímico baseado em polímero molecularmente impresso em
superfície nanoestruturada com óxido de grafeno reduzido para
determinação enantiosseletiva de (D) e (L)-limoneno**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos
Stradiotto

**Araraquara
2024**

P659s Pinto, Bruna Gabrielle Olsen
Sensor eletroquímico baseado em polímero molecularmente impresso em superfície nanoestruturada com óxido de grafeno reduzido para determinação enantiosseletiva de (D) e (L)-limoneno / Bruna Gabrielle Olsen Pinto. -- Araraquara, 2024
95 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Nelson Ramos Stradiotto

1. Limoneno. 2. Enantiômeros. 3. Nanopartículas. 4. Óxido de grafeno. 5. Impressão molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Sensor eletroquímico baseado em polímero molecularmente impresso em superfície nanoestruturada com óxido de grafeno reduzido para determinação enantiosseletiva de (D) e (L)-limoneno"

AUTORA: BRUNA GABRIELLE OLSEN PINTO

ORIENTADOR: NELSON RAMOS STRADIOTTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Química, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. NELSON RAMOS STRADIOTTO (Participação Presencial)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. WILLIAM REIS DE ARAÚJO (Participação Presencial)
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Profa. Dra. MÁISA AZEVEDO BELUOMINI (Participação Presencial)
Departamento de Biotecnologia / Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinária - UNESP - Jaboticabal

Araraquara, 25 de julho de 2024

Impacto potencial da pesquisa

A construção de sensores eletroquímicos vem ganhando grande notoriedade na literatura devido à sua capacidade de detectar uma gama de substâncias relevantes para diversas áreas, possuindo uma grande sensibilidade e seletividade e permitindo o desenvolvimento de metodologias inovadoras. Sendo assim, nessa dissertação, a determinação enantiosseletiva de moléculas de limoneno usando sensor eletroquímico baseado em polímero molecularmente impresso é altamente vantajosa, considerando que o (D) e (L)-limoneno coexistem em diversas espécies de pinheiro e nos resíduos agroindustriais de laranja, sendo que cada enantiômero possui sua própria aplicação. Portanto, a disponibilidade de um método único, ágil e seletivo para identificar ambas as moléculas trarão grande impacto e contribuição científica, atuando como uma alternativa eficiente, visto que não há nenhum método eletroanalítico para determinação de ambos os analitos em um único dispositivo. Além disso, esse trabalho está relacionado ao projeto de fruto-refinaria, que visa o reaproveitamento de resíduos agroindustriais com o intuito de dar uma destinação mais favorável a esses resíduos, produzindo compostos de maior valor agregado.

Potential impact of the research

The construction of electrochemical sensors has achieved great notoriety in literature due to their capacity of detection of a range of substances relevant to different areas, having a great sensitivity and selectivity and allowing the development of innovative methodologies. In this sense, in this thesis, the enantioselective determination of limonene molecules using an electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer is highly advantageous, considering that (D) and (L)-limonene coexist in orange agroindustrial residues, with each enantiomer having their own application. Therefore, the availability of an agile and selective method to identify both molecules will have a big impact and scientific contribution, acting as an efficient alternative since there is no electroanalytical method for the determination of both analytes in a single device. Furthermore, this work is related to the fruit-refinery project, with aims to reuse agroindustrial residues to have a favorable destination of this waste, producing compound with a greater added value.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Bruna Gabrielle Olsen Pinto
Nome em citações bibliográficas: OLSEN, B. G., PINTO, B. G. O.
Nacionalidade: Brasileira
Nascimento: 19/02/1998 – Santo André – SP – Brasil

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Endereço: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica
Av. Prof. Francisco Degni, 55, Jardim Quitandinha
Araraquara, SP – Brasil – 14800-900
Telefone: (16) 3301 – 9581
E-mail: bruna.olsen@unesp.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2022 – 2024 Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Araraquara, Brasil

Título: Sensor eletroquímico baseado em polímero molecularmente impresso em superfície nanoestruturada com óxido de grafeno reduzido para determinação enantiosseletiva de (D) e (L)-limoneno de resíduos agroindustriais de laranja.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

2017 – 2022

Graduação em Química - Licenciatura

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Araraquara, Brasil

Título: Uma proposta de Unidade Didática Multiestratégica para
o ensino de química ambiental em uma perspectiva dos 3MP.

Orientador: Prof. Dr. Amadeu Moura Bego

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

OLSEN, B. G. et al. *Alternative method for rhamnolipids quantification using an electrochemical platform based on reduced graphene oxide, manganese nanoparticles and molecularly imprinted Poly (L-Ser)*. **Talanta**, v. 272, p. 125778, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.125778>. (IF: 6,1)

FALONE, M. F.; **OLSEN, B. G.**; BUFFON, E.; STRADIOTTO, N. R. *Electrochemical Sensing of Palmitic Acid in Guava Oil Using a Surface Modified with Reduced Graphene Oxide-Decorated Manganese Nanoparticles and Electropolymerized Poly(L-serine) Film*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 135, p. 106550, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106550> (IF: 4,3)

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos:

OLSEN, B. G.; STRADIOTTO, N. R. Enantioselective Detection of (D)-and (L)-Limonene from Essential Oil Samples Using a Molecularly Imprinted Polypyrrole Electrochemical Sensor. Apresentação oral. 245th Electrochemical Society (ECS) Meeting – São Francisco – CA – EUA. 2024.

OLSEN, B. G.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical device based on molecularly imprinted poly(pyrrole) on surface containing metallic nanoparticles and reduced graphene oxide for the enantioselective determination of (D)- and

(L)-limonene. Apresentação oral. XXIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE) – Porto Alegre - RS. 2023.

OLSEN, B. G.; FALONE, M. F.; BUFFON, E.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polyaminoacid containing rGO and MnNPS for the determination of palmitic acid. Apresentação de pôster. 20º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) – Bento Gonçalves – RS. 2022.

PINTO, B. G. O., FALONE, M. F., BUFFON, E., STRADIOTTO, N. R. Molecularly imprinted electrochemical sensor on nanostructured surface with manganese nanoparticles and polyaminoacid for determination of 3-hydroxydecanoic acid obtained from agroindustrial guava waste. Apresentação oral. 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (RA SBQ). Maceió – AL. 2022.

Participação em eventos científicos:

OLSEN, B. G.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer on surface containing metallic nanoparticles and reduced graphene oxide for the enantioselective determination of (D) and (L)-limonene in agroindustrial waste. In: IV Workshop de Fruto-Refinaria. 2024. Rio Claro – SP.

PINTO, B. G. O., FALONE, M. F., BUFFON, E., STRADIOTTO, N. R. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polyaminoacid containing rGO and MnNPS for the determination of palmitic acid. In: III Workshop de Fruto-Refinaria. 2023. (Virtual).

PINTO, B. G. O., FALONE, M. F., BUFFON, E., STRADIOTTO, N. R. Molecularly imprinted electrochemical sensor on nanostructured surface with reduced graphene oxide and manganese nanoparticles for the determination of 3-hydroxydecanoic acid obtained from agroindustrial guava waste. In: II Workshop de Fruto-Refinaria, 2022. (Virtual).

*Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre demonstram que sentem orgulho do
caminho que estou trilhando.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais e meu irmão, Rosalvo, Érica e Willian, por todo o apoio em todos os aspectos e por me ajudarem sempre sem medir esforços.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto, pela oportunidade de trabalhar nessa área desde a iniciação científica, pelos ensinamentos, pela liberdade de desenvolver meus trabalhos, por todas as oportunidades de apresentar meus trabalhos em congressos científicos, por acreditar no meu potencial e fazer eu me apaixonar pela pesquisa.

Ao Instituto de Química de Araraquara, pela infraestrutura e pelos recursos disponibilizados para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Matheus (Mathias), que me ajudou durante todo o meu mestrado, no tratamento de dados, com aulas de Origin e de eletroquímica, pela parceria no dia a dia no laboratório com ótimas *playlists*, na copa e na cantina. Obrigada por toda a ajuda, espero que eu tenha te ajudado de alguma forma assim como você me ajudou, valeu “*menó*”!

Aos amigos que fiz no grupo de pesquisa, Gabriel, Babi, Max Falone, Maísa, Alexia, Casadão e Edervaldo (*in memoriam*), que tornaram os dias no laboratório mais fáceis e mais alegres.

Aos amigos que estiveram do meu lado durante o meu percurso, por todo o apoio e por toda a ajuda que me deram para concluir esse trabalho, Catarina, Lucas, Natália, Nicolás, Ragnar e Vitória (em ordem alfabética para não ter briga falando que prefiro um ou outro).

A todos do Grupo de Eletroanalítica de Araraquara (GEAr) e NDCOM.

À Profa. Dra. Maisa Beluomini e Profa. Dra. Hideko Yamaka pelas sugestões no Exame Geral de Qualificação.

À banca avaliadora da defesa do mostrado, Profa. Dra. Maisa Beluomini e Prof. Dr. William Reis por todas as modificações sugeridas e correções feitas, que ajudaram a enriquecer esse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado concedida (processo nº 2023/00817-9) e pelo auxílio financeiro concedido pelo projeto temático de fruto-refinaria (processo nº 2017/22401-8).

Ao Laboratório de Espectroscopia de Fotoelétrons (LEFE) e o Prof. Dr. Peter Hammer, pela realização das análises de XPS.

Ao Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) e a Dra. Sonia Maria Zanetti, pela realização das análises de SEM.

A todos os professores que eu tive durante toda a minha caminhada.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar até aqui e não foram mencionados, muito obrigada!

RESUMO

O limoneno é um composto terpeno monocíclico que possui dois isômeros, o (D) e (L)-limoneno, encontrados em diferentes quantidades e proporções em diversas frutas cítricas, árvores de pinho, hortelã e manjeriço, e as diferentes aplicações desse composto dependem do enantiômero (D) ou (L), sendo muito usado na indústria alimentícia, de cosméticos, farmacêutica e de produtos de limpeza. Este composto pode ser obtido a partir de destilação a vapor de casca e da polpa cítrica que são resultantes da produção do suco, por óleos prensados a frio ou da desterpenação de outros óleos. Sendo assim, é extremamente relevante o desenvolvimento de métodos para determinação desse composto enantiomérico. A determinação de enantiômeros tem sido feita por métodos analíticos envolvendo técnicas cromatográficas, espectroscópicas e eletroquímicas. Dentre as técnicas eletroquímicas, a utilização de sensores eletroquímicos tem apresentado grande destaque na literatura pelas excelentes características apresentadas, como grande seletividade, baixos limites de detecção, menor custo instrumental, menores volumes de amostra necessário para as análises e a possibilidade de portabilidade. Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo a construção de um sensor eletroquímico para determinação enantiosseletiva de (D) e (L)-limoneno, obtidos a partir de óleos essenciais de laranja e pinho. Esse sensor, constituído de um eletrodo de carbono vítreo, foi modificado com nanopartículas de ouro em óxido de grafeno reduzido, sendo essa superfície nanoestruturada recoberta com um polímero molecularmente impresso de polipirrol, formando o GCE/rGO/AuNPs/MIP. O sensor foi caracterizado por voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X e microscopia eletrônica de varredura, com o intuito de confirmar as modificações feitas na superfície do eletrodo. O sensor desenvolvido teve como figuras de mérito para o (D)-limoneno um limite de detecção de $1,8 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹, limite de quantificação de $5,5 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹ e sensibilidade amperométrica de $5,8 \times 10^5$ A L mol⁻¹, em faixa linear de estudo que variou de $2,0 \times 10^{-12}$ a $1,0 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹. Para o (L)-limoneno, o limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade amperométrica foram, respectivamente, $1,4 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹, $4,3 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹ e $6,2 \times 10^6$ A L mol⁻¹, com a mesma faixa linear estudada que o (D)-limoneno. O sensor foi aplicado em amostras de óleo essencial de laranja e de pinho, para determinação de ambos enantiômeros, encontrando como produto majoritário no óleo de laranja o (D)-limoneno, em uma concentração de $(11,7 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1})$ (n=3), e no óleo de pinho o (L)-limoneno foi o composto majoritário, com uma concentração de $(0,51 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1})$ (n=3). O sensor exibiu uma melhor seletividade para o limoneno em comparação com possíveis interferentes presentes em ambos os óleos essenciais, como mirceno, valenceno e sabineno para o óleo de laranja e borneol, terpineno e canfeno para óleo de pinho. A repetibilidade intradia foi estudada com 10 medidas em um mesmo eletrodo, tendo um desvio padrão relativo de 4,8%, repetibilidade interdia com a construção de 10 sensores com desvio de 4,3% e a estabilidade avaliada durante 16 dias, preservando a corrente obtida inicialmente em 89% e com desvio de 4,9%.

Palavras-chave: limoneno; enantiômeros; nanopartículas; óxido de grafeno; impressão molecular.

ABSTRACT

Limonene is a monocyclic terpene compound that has two isomers, (D) and (L)-limonene, found in different quantities and proportions in several citrus fruits, pine trees, mint, and basil, and the different applications of this compound depends on the (D) or (L) enantiomer, being mostly used in food, cosmetics, pharmaceutical and cleaning products industry. This compound can be obtained from steam distillation of the peel and citrus pulp resulting from juice production, from cold pressed oils or oil deterpenation. In this way, it is extremely relevant the development of methods for the determination of this enantiomeric compound. The enantiomer determination has been made by analytical methods involving chromatographic, spectroscopic and electrochemical techniques. Among the electrochemical techniques, the use of electrochemical sensors has been highlighted due to its excellent characteristics such as selectivity, low limit of detection, lower instrumental cost, low sample volume required for the analysis and the possibility of portability. In this context, this work aimed the construction of an electrochemical sensor for the enantioselective determination of (D) and (L)-limonene, obtained from orange and pine essential oil. This sensor consists of a glassy carbon electrode, modified with gold nanoparticles in reduced graphene oxide, this nanostructured surface being covered with a molecularly imprinted polymer of pyrrole, forming the GCE/rGO/AuNPs/MIP. The sensor was characterized with cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, x-ray photoelectron spectroscopy and scanning electronic microscopy, for the confirmation of the modifications made on the electrode surface. The analytical methodology developed had as figures of merit for (D)-limonene a limit of detection of 1.8×10^{-12} mol L⁻¹, limit of quantification 5.5×10^{-12} mol L⁻¹ and amperometric sensitivity of 5.8×10^5 A L mol⁻¹, in a linear range of 2.0×10^{-12} a 1.0×10^{-11} mol L⁻¹. For the (L)-limonene, the limit of detection, limit of quantification and amperometric sensitivity was, respectively, 1.4×10^{-12} mol L⁻¹, 4.3×10^{-12} mol L⁻¹ e 6.2×10^6 A L mol⁻¹, with the same linear range studied for the (D)-limonene. The sensor was applied in sample of orange and pine essential oil, for the determination of both enantiomers, found as major product in orange oil the (D)-limonene, in a concentration of 11.7 g L⁻¹, and in pine oil the (L)-limonene is the main compound, with a concentration of 0.51 g L⁻¹. The sensor exhibits a better selectivity for limonene in comparison with possible interferents present in both essential oils, such as myrcene, valencene and sabinene for orange essential oil and borneol, terpinene and camphene for pine oil. The intra-day repeatability was studied with 10 measurements on the same electrode, with a relative standard deviation of 4.8%, repeatability inter-day with the construction of ten different electrodes with a deviation of 4.3% and the stability evaluated for 16 days, preserving the initial current obtained in 89% with a deviation of 4,9%.

Keywords: limonene; enantiomers; nanoparticles; graphene oxide; molecularly imprinted.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das moléculas de (D)-limoneno e (L)-limoneno.....	23
Figura 2: Esquema de obtenção do óxido de grafeno reduzido a partir de grafite	27
Figura 3: Estrutura molecular do pirrol.	30
Figura 4: Esquema geral para a formação de MIP.....	30
Figura 5: Representação da formação de duas camadas com enantiômeros específicos pela abordagem “layer-by-layer” em superfície eletródica.....	33
Figura 6: Representação da formação da camada com ambos enantiômeros pela abordagem “one-by-one” em superfície eletródica	34
Figura 7: Voltamograma cíclico para GCE em solução de 0,50 mg mL ⁻¹ de GO em Na ₂ SO ₄ 0,10 mol L ⁻¹ , com velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	42
Figura 8: Estudo do perfil eletroquímico de ouro sobre GCE usando solução de HAuCl ₄ 6,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ , velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	43
Figura 9: Variação da corrente em função de diferentes valores de cargas aplicadas em superfície de GCE/rGO em solução de HAuCl ₄ 6,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹	44
Figura 10: Voltamogramas cíclicos do estudo de diferentes velocidades de varredura entre 10 e 300 mV s ⁻¹ em solução de K ₃ [Fe(CN) ₆] 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ de A) GCE, B) GCE/rGO, C) GCE/rGO/AuNPs e D) relação linear entre a corrente (i) e raiz quadrada da velocidade.	45
Figura 11: Estudo do monômero funcional escolhido para a formação do filme polimérico em sonda eletroquímica de K ₃ [Fe(CN) ₆] 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ com A) anilina 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ em H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ ; B) orto-fenilenodiamina 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ em tampão acetato pH 5; C) pirrol 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ em tampão fosfato pH 7.	48
Figura 12: Esquema das etapas de construção do sensor GCE/rGO/AuNPs/MIP para determinação enantiosseletiva de limoneno	49
Figura 13: Voltamogramas cíclicos de A) Pirrol 3,0×10 ⁻² mol L ⁻¹ em tampão fosfato (pH 7,0, 0,1 mol L ⁻¹) e tampão fosfato, com velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ ; B) eletropolimerização de pirrol na superfície do GCE/rGO/AuNPs no intervalo de potencial de 0,0V a 1,0V, por 5 ciclos em tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹	

¹ , pH 7,0) contendo $5,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de (D)-limoneno e $5,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de (L)-limoneno, com velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	50
Figura 14: Mecanismo de eletropolimerização do PPy.	51
Figura 15: Voltamogramas cíclicos para GCE, GCE/rGO, GCE/rGO/AuNPs, GCE/rGO/AuNPs/MIP e GCE/rGO/AuNPs/NIP. As medidas foram realizadas em solução de concentração $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ⁻³ e KCl 0,1 mol L ⁻¹ , na faixa de potencial de -0,2 V a 0,6 V (50 mV s ⁻¹).	52
Figura 16: CV para superoxidação do GCE/rGO/AuNPs/MIP durante 5 ciclos em NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ , no intervalo de 0 V a 1,5 V.	53
Figura 17: Voltamogramas cíclicos para GCE/rGO/AuNPs/MIP antes da extração, após a extração e após as religações do (D) e (L)-limoneno. As medidas foram realizadas em solução de concentração $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ⁻³ e KCl 0,1 mol L ⁻¹ , na faixa de potencial de -0,2 V a 0,6 V (50 mV s ⁻¹).	54
Figura 18: Variação de corrente obtida no estudo da influência da concentração de Py durante a eletropolimerização do MIP, monitorado por DPV e sonda eletroquímica de K ₃ [Fe(CN) ₆] $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução de 0,10 mol L ⁻¹ KCl.	56
Figura 19: Estudo da influência da quantidade de ciclos durante a eletropolimerização do MIP, monitorado por DPV em K ₃ [Fe(CN) ₆] $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução de 0,10 mol L ⁻¹ KCl.....	57
Figura 20: Variação de corrente obtida no estudo do pH durante a eletropolimerização do MIP, monitorado por DPV e sonda eletroquímica de K ₃ [Fe(CN) ₆] $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução de 0,10 mol L ⁻¹ KCl.....	58
Figura 21: Variação de corrente obtida no estudo dos ciclos de extração, monitorado por DPV e sonda eletroquímica de K ₃ [Fe(CN) ₆] $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução de 0,10 mol L ⁻¹ KCl.....	59
Figura 22: Variação de corrente obtida no estudo do tempo de religação, monitorado por DPV e sonda eletroquímica de K ₃ [Fe(CN) ₆] $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução de 0,10 mol L ⁻¹ KCl.....	60
Figura 23: Imagens de SEM com magnitude de 10.000x para A) GCE, B) GCE/rGO, C) GCE/rGO/AuNPs e D) GCE/rGO/AuNPs/MIP, E) espectro de EDS e F) histograma da distribuição do tamanho das nanopartículas (n = 100).....	62

Figura 24: Diagrama de Nyquist para A) GCE, GCE/rGO, GCE/rGO/AuNPs, GCE/rGO/AuNPs/MIP e GCE/rGO/AuNPs/NIP e B) GCE/rGO/AuNPs/MIP antes da extração, após a extração e após as ligações do (D) e (L)-limoneno. As medidas foram realizadas em solução de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, amplitude de 0,01 V_{RMS} e potencial de 0,22V.....	64
Figura 25: Espectros deconvoluídos de XPS para C1s, O1s, Au4f e N1s.	65
Figura 26: Curva analítica para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP após 5 minutos de ligação em diferentes concentrações de (D)-limoneno. Inserção: DPV para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP após 5 minutos de ligação em diferentes concentrações. As medidas foram realizadas em solução de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	67
Figura 27: Curva analítica para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP após 5 minutos de ligação em diferentes concentrações de (L)-limoneno. Inserção: DPV para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP após 5 minutos de ligação em diferentes concentrações. As medidas foram realizadas em solução de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	68
Figura 28: Variação de corrente monitorada usando sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3} 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . obtida para os eletrodos GCE/rGO/AuNPs/MIP e GCE/rGO/AuNPs/NIP após 5 minutos de ligação em solução contendo $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de cada molécula em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.	70
Figura 29: Variação de corrente monitorada usando sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3} 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . obtida para os eletrodos GCE/rGO/AuNPs/MIP e GCE/rGO/AuNPs/NIP após 5 minutos de ligação em solução contendo $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de cada molécula em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0	71
Figura 30: Estudo de repetibilidade com 10 medidas A) intradia e B) interdia. 73	
Figura 31: Estudo de estabilidade durante 16 dias.	73
Figura 32: Curvas de adição de padrão para determinação da A) (D)-limoneno e B) (L)-limoneno em óleo essencial de laranja.	75

Figura 33: Curvas de adição de padrão para determinação do A) (D)-limoneno e B) (L)-limoneno em óleo essencial de pinho. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de trabalhos de sensores para enantiômeros reportados na literatura.	32
Tabela 2: Parâmetros voltamétricos calculados para GCE, GCE/rGO e GCE/rGO/AuNPs.....	46
Tabela 3: Parâmetros experimentais otimizados que influenciam o desempenho analítico do GCE/rGO/AuNPs/MIP.	61
Tabela 4: Parâmetros de seletividade avaliados para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP em relação à detecção de (D)-limoneno.....	71
Tabela 5: Parâmetros de seletividade avaliados para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP em relação à detecção de (L)-limoneno.	72
Tabela 6: Determinação de (D) e (L)-limoneno em óleo essencial de laranja e pinho, respectivamente (n=3).	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag/AgCl	Prata/Cloreto de prata
AuNPs	Nanopartículas de ouro
Covid-19	Doença do coronavírus (do inglês, <i>corona virus disease</i>)
CV	Voltametria cíclica (do inglês, <i>cyclic voltammetry</i>)
CPE	Elemento de fase constante (do inglês, <i>constant phase element</i>)
DPV	Voltametria de pulso diferencial (do inglês, <i>differential pulse voltammetry</i>)
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (do inglês, <i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês, <i>electrochemical impedance spectroscopy</i>)
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GCE	Eletrodo de carbono vítreo (do inglês, <i>glassy carbon electrode</i>)
GO	Óxido de grafeno (do inglês, <i>graphene oxide</i>)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MIP	Polímero molecularmente impresso (do inglês, <i>molecularly imprinted polymer</i>)
n	Número de réplicas de uma medida
NIP	Polímero não-impresso (do inglês, <i>non-imprinted polymer</i>)
PPy	Polipirrol (do inglês, <i>polipyrrole</i>)

Pt	Platina
Py	Pirrol (do inglês, <i>pyrrole</i>)
RCT	Resistência de transferência de carga
rGO	Óxido de grafeno reduzido (do inglês, <i>reduced graphene oxide</i>)
RS	resistência da solução
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, <i>relative standard deviation</i>)
SD	Desvio padrão (do inglês, <i>standard deviation</i>)
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (do inglês, <i>scanning electron microscopy</i>)
vs	<i>Versus</i>
W	Elemento de impedância de Warburg
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons de raio-X (do inglês, <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)

SUMÁRIO

1 Introdução	21
1.1 Fruticultura	21
1.2 Limoneno	22
1.3 Métodos de determinação de limoneno	24
1.4 Sensores eletroquímicos	25
1.4.1 Óxido de grafeno reduzido	26
1.4.2 Nanopartículas metálicas	28
1.4.3 Polímeros molecularmente impresso	29
1.4.4 Sensores para determinação de enantiômeros usando MIP	31
2 Objetivos	36
2.1 Objetivo geral:	36
2.2 Objetivos específicos	36
3 Parte experimental	37
3.1 Materiais e reagentes	37
3.2 Equipamentos	37
3.3 Limpeza do GCE	38
3.4 Eletrodeposição de rGO	38
3.5 Modificação com nanopartículas de ouro	39
3.6 Preparação do filme polimérico molecularmente impresso	39
3.7 Medidas eletroquímicas	39
3.8 Determinação de (D) e (L)-limoneno em amostra real	40
4 Resultados e discussão	42
4.1 Construção do eletrodo modificado	42
4.1.1 Comportamento rGO	42
4.1.2 Comportamento das AuNPs	43
4.1.3 Determinação da área eletroativa	45

4.1.4 Estudo do monômero funcional	47
4.2 Construção do sensor eletroquímico.....	49
4.2.1 Eletropolimerização de PPy em GCE/rGO/AuNPs	49
4.2.2 Processo de religação	53
4.2.3 Otimização de parâmetros da construção do eletrodo	55
4.2.3.1 Efeito da concentração do monômero funcional.....	56
4.2.3.2 Efeito da quantidade de ciclos de eletropolimerização	57
4.2.3.3 Efeito do pH de eletropolimerização	58
4.2.3.4 Efeito da quantidade de ciclos de extração	59
4.2.3.5 Efeito do tempo de religação.....	60
4.2.4 Caracterização do eletrodo	61
4.2.5 Desempenho analítico do eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP.....	65
4.2.6 Estudo de seletividade	68
4.2.7 Estudo de repetibilidade e estabilidade.....	72
4.2.8 Determinação do (D) e (L)-limoneno em óleo essencial de laranja e pinho	74
5 Conclusões	77
Referências	79

1 Introdução

1.1 Fruticultura

A fruticultura é um setor muito relevante na agricultura mundial e brasileira. Estima-se que o Brasil produziu cerca de 42 milhões de toneladas de frutas no ano de 2021, gerando uma receita de mais de R\$ 49,8 bilhões, ficando atrás apenas da China, que produziu cerca de 265 milhões de toneladas de frutas, e da Índia, que produziu 92 milhões de toneladas [1]. As frutas com as maiores produções no Brasil são laranja (39,2%), banana (16,5%), melancia (5,2%), uva (4,2%) e abacaxi (3,7%), sendo que essa variedade de frutas e alta produtividade estão diretamente relacionados com as boas condições climáticas do país em todas as estações do ano. Estima-se que a produção de frutas no ano de 2023 tenha atingido a marca de 58 milhões de toneladas, segundo dados fornecidos pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) [1].

O crescimento da fruticultura é extremamente importante para o desenvolvimento do país, pois, além de gerar empregos, estimando-se cerca de 193,9 mil trabalhadores formais em 2021, movimenta também a economia positivamente e gera renda no mercado interno e externo. Foi observado que não houve expansão da área de cultivo geral, porém teve um aumento da produtividade por hectare [1].

A região Sudeste do Brasil é a maior produtora do setor de frutas no país, sendo responsável por aproximadamente 41% de toda a produção nacional, que corresponde a aproximadamente 16,9 milhões de toneladas de frutas produzidas anualmente, seguido pelas regiões Nordeste (21,5%), Sul (17,3%), Norte (14,5%) e Centro-Oeste (5,8%). Conforme dados de 2020, foi plantado no estado de São Paulo mais de 2,5 milhões de hectares de frutas, sendo a maior produção do estado a laranja, totalizando 12,5 milhões de toneladas e representando 76% referente à produção total nacional, seguida de limão, com uma produção de 1,1 milhão de toneladas, banana (1 milhão de toneladas), melancia (226 mil toneladas) e uva (169 mil toneladas). O Brasil tem grande destaque sendo o maior produtor mundial e exportador de laranja, sendo na forma in natura e principalmente na exportação do suco [1].

No ano de 2021, o Brasil foi responsável pela exportação de 1,2 milhão de toneladas de frutas, totalizando uma receita de mais de US\$1 bilhão. Já para

o ano de 2022, notou-se uma ligeira queda na exportação, sendo de 1 milhão de toneladas de frutas exportadas nesse ano com uma receita de US\$970 milhões. Essa queda está diretamente relacionada pela crise geopolítica centrada no continente europeu, que é o principal mercado, e a crise econômica decorrente da nova onda da pandemia do Covid-19 que aconteceu em 2022 [1]. Para 2023, no entanto, foi estimado pela Embrapa que houve uma recuperação no mercado internacional de exportação, e, junto com a alta produtividade e o clima favorável do último ano, a receita retornou a marca atingida em 2021 e inclusive ultrapassou a lucratividade esperada. Apesar de ser um importante fornecedor global, o Brasil também é responsável por uma parcela de importação de frutas internacionais, chegando na faixa de 200 mil toneladas em 2022 [1].

No mercado interno, as frutas são principalmente vendidas in natura e em forma de suco e doces. No processamento industrial dessas frutas são gerados resíduos que podem ser descartados de forma irregular, contribuindo com a contaminação do meio ambiente [2,3] e colaborando com o desperdício de diversos compostos, uma vez que esses resíduos podem gerar compostos com alto valor agregado [4]. No caso da laranja, a fruta com a maior produção no país, os resíduos são constituídos principalmente de casca, sementes e bagaço, correspondente a 50% da massa total da fruta [5,6]. Quando manejado, esse descarte pode resultar na obtenção de subprodutos com alto valor agregado como açúcares, pectina, flavonoides e óleos essenciais, que tem como principal constituinte o limoneno, que é muito utilizado principalmente nas indústrias química, farmacêutica, alimentícia e de cosméticos [5,7]. Sendo assim, no conceito da fruto-refinaria é importante o reaproveitamento desses resíduos para obtenção desses compostos que possuem alto valor agregado.

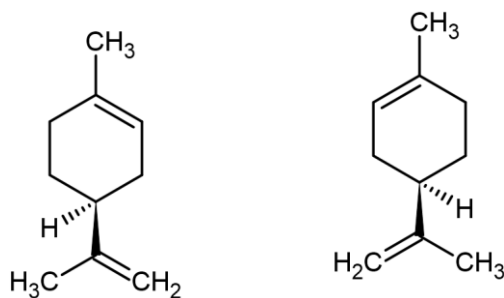
1.2 Limoneno

Os óleos essenciais vêm ganhando destaque devido as suas propriedades biológicas e amplo uso em alimentos, cosméticos e indústria farmacêutica de uma maneira geral. O limoneno é um dos principais compostos encontrado em diversos óleos essenciais reportados na literatura, principalmente em óleo essencial de frutas cítricas como a laranja, tangerina e o limão [8]. No caso do óleo essencial de laranja, que é obtido principalmente na casca da fruta, a concentração de limoneno presente pode chegar de 36% até 95% da

composição total, sendo que essa variação está diretamente relacionada com a espécie da fruta, do cultivo, de fatores ambientais e da forma em que o óleo essencial foi extraído, tendo como principal composto o enantiômero (D) [8–11]. Esse composto também é encontrado amplamente em óleos essenciais de pinho, com uma variação na concentração de acordo com a espécie da árvore. No caso da *Picea abies*, a concentração de limoneno pode chegar a 22%, sendo que aproximadamente 17% representam o (L)-limoneno e apenas 4% é referente ao (D)-limoneno [12,13]. O (L)-limoneno também é comumente encontrado em óleo de menta e hortelã [13–16] e em uma menor quantidade em manjerição [17].

O limoneno, 1-metil-4-(1-metilfenil)ciclohexeno, de fórmula $C_{10}H_{16}$, é um composto terpeno monocíclico que possui dois isômeros óticos, o (D)-limoneno, também conhecido como (R)-(+)-limoneno, e (L)-limoneno, também (S)-(-)-limoneno (Figura 1), encontrados em uma variedade de plantas e frutas em diferentes quantidades e proporções nas formas opticamente ativas ou como uma mistura racêmica [18]. Estes compostos podem ser obtidos a partir de destilação a vapor de casca e polpa da laranja [19,20], resultantes da produção do suco, e óleos prensados a frio ou da desterpenação de óleos [21].

Figura 1: Representação das moléculas de (D)-limoneno e (L)-limoneno.



Fonte: elaborado pelo autor.

Embora ambos os isômeros tenham propriedades similares, o uso preferencial de cada um depende da finalidade para a qual é empregado. O (D)-limoneno é um solvente eficaz para a remoção de graxas e óleos, além de ser utilizado na fabricação de plásticos, borrachas, tintas e vernizes, na área de cosméticos e produtos de higiene pessoal, como sabonetes e shampoo e na indústria farmacêutica [7,18,21]. Já o (L)-limoneno é usado principalmente na indústria de alimentos e bebidas como um saborizante natural, devido à

diferentes propriedades organolépticas em relação ao (D)-limoneno, e na produção de produtos de limpeza [16,18,22].

Esses compostos isoméricos apresentam baixa toxicidade, não são mutagênicos nem carcinogênicos e são amplamente utilizados em diversas áreas, como na indústria farmacêutica na prevenção de doenças degenerativas, no tratamento de câncer e antitumoral [23,24], em antioxidantes e ansiolíticos [25,26], em repelentes [27] e inseticidas [18,28], em cosméticos e como fragrância de perfumes e sabonetes [18,29], na indústria de bebidas e alimentícia [18,29,30] e em produtos de limpeza [18,29,31,32].

Com essa gama de aplicações, a determinação analítica dos isômeros óticos do limoneno é extremamente relevante e fundamental no processo de reaproveitamento dos resíduos dentro da biorrefinaria.

1.3 Métodos de determinação de limoneno

Na literatura são reportados diferentes métodos para a determinação do limoneno, dentre estes, podem ser citados a determinação por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) [33–42], GC-MS com micro extração em fase sólida (HS-SPME) [43–47] e acoplada à espectrometria de massas em tandem [48], GC com detecção de ionização de chama [49–51], cromatografia líquida de alta performance (HPLC) [52,53], cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem [54] e ultra-HPLC [55].

Apesar dos métodos cromatográficos apresentarem grande seletividade e baixos LD, as técnicas eletroanalíticas apresentam vantagens em relação a estes por terem um baixo custo relativo, possuir excelente sensibilidade e seletividade, menor tempo de análise, simplicidade no manuseio, baixo volume de amostra utilizada e muitas vezes sem necessidade de pré-tratamento da amostra a ser analisada [56,57]. No entanto, até o presente momento não há relatado de nenhum método analítico utilizando sensores eletroquímicos para determinação enantiosseletiva do (D)- e (L)-limoneno.

Há também sensores encontrados na literatura para a determinação do limoneno, dentre estes foram reportados trabalhos que utilizam uma microbalança de cristal de quartzo (QCM) e acoplada a um nariz óptico para resposta em vapores de álcoois [58–63]. É reportado também um eletrodo

baseado em grafeno dopado com enxofre, utilizado para determinação do (D)-limoneno em bebidas e que apresenta um limite de detecção (LD) de $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ [64], um sensor eletroquímico de nanopartículas de ouro (AuNPs) derivadas com tiol para determinação de limoneno em amostra real de hálito de paciente com cirrose, com LD de $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ [65], um biossensor com transistor de efeito de campo de grafeno para atuar como um nariz bioeletrônico para determinar moléculas de odores, dentre estas o limoneno [66], um conjunto de sensores baseados em compósito de carbono e polímero, para determinar compostos orgânicos voláteis secretados por plantas quando atacada por insetos, tendo como um dos principais compostos o limoneno [67]. Por fim, são reportados semicondutores de óxido metálico quimiorresistivo, com respostas de 2,5 a 100 ppb para (D)-limoneno, tendo como melhor resposta o sensor baseado em WO₃ [68].

1.4 Sensores eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos são dispositivos em que um eletrodo é usado como um elemento transdutor e ocorre uma reação de redução ou oxidação na sua superfície, sendo que a resposta obtida é um sinal elétrico detectável que pode ser em potencial, corrente ou condutividade [69]. Existem diferentes tipos de sensores, sendo que recebe destaque os sensores potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, impedimétrico e voltamétrico. A diferença entre esses sensores está relacionada com a forma em que é feita a análise e da resposta obtida. Os sensores potenciométricos são usados para medir a diferença de potencial proporcional à atividade de um sistema; os amperométricos possuem um potencial fixo definido aplicado entre os eletrodos de referência e de trabalho, em que é analisada a variação de corrente como resposta da reação ocorrendo na superfície do eletrodo; os sensores condutimétricos possui uma variação de condutividade elétrica ocorrendo no meio reacional; impedimétricos medem a impedância elétrica do sistema, que se refere à resistência à passagem de corrente no eletrodo; e os sensores voltamétricos monitora a corrente elétrica em função do potencial aplicado [69–71].

Em adição às vantagens já apresentadas para o uso de sensores eletroquímicos frente a outros métodos, esses dispositivos podem ser portáteis,

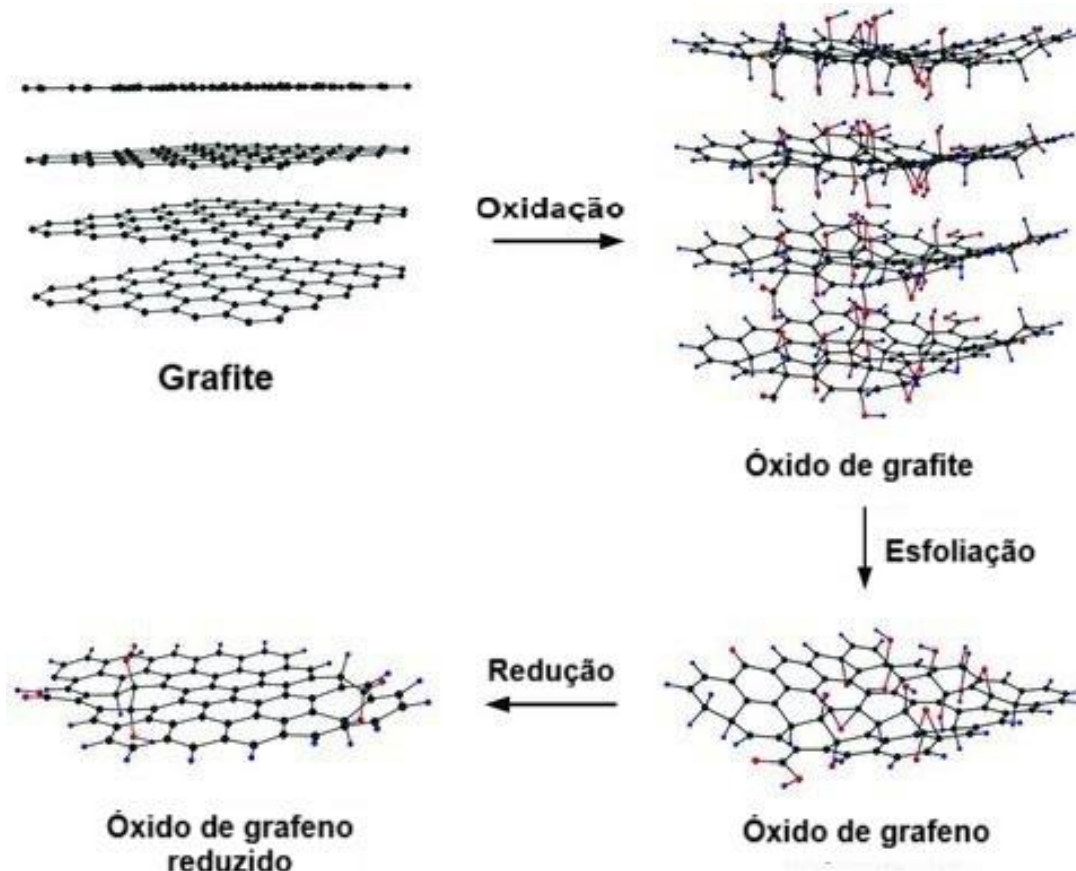
vestíveis e de fácil miniaturização. Além disso, estes podem ser modificados com espécies imobilizadas na superfície do eletrodo, com o intuito de melhorar seu desempenho analítico, melhorar a seletividade, a detectibilidade e a área superficial, por facilitar a transferência de carga [72]. Uma grande quantidade de materiais tem sido estudada para modificar a superfície dos eletrodos, dentre esses têm-se os nanomateriais de carbono [73], como grafeno, óxido de grafeno reduzido (rGO, do inglês *reduced graphene oxide*) [74], fulereno [75] e nanotubos de carbono [76]. Outros nanomateriais materiais são usados para a modificação de sensores eletroquímicos, como as nanopartículas metálicas [77,78]. Para aumentar a seletividade dos sensores, tem sido muito reportado eletrodos modificados baseados em polímeros molecularmente impresso, os MIPs (do inglês – *molecularly imprinted polymer*) [79,80]. Para essas modificações na superfície do eletrodo é necessário fazer a escolha de um substrato que possua uma superfície que seja reproduzível e de fácil modificação, como os eletrodos de carbono vítreo (GCE, do inglês *glassy carbon electrode*), podendo ser estudada em uma ampla janela de potencial e à alta resistência química e mecânica [72,81]. Portanto, modificar a superfície eletródica com os materiais supracitados auxilia no aumento da performance analítica dos sensores para a determinação de compostos de interesse.

1.4.1 Óxido de grafeno reduzido

Materiais baseado em carbono são formados por uma ou mais camadas em configuração hexagonal, sendo que os carbonos possuem hibridização sp^2 , formando diferentes estruturas alotrópicas [56,82]. A forma alotrópica de grafeno, material bidimensional e formada por uma monocamada densamente empacotada e com uma nuvem eletrônica formada por elétrons π conjugados, é usada na construção de sensores por possuir propriedades intrínsecas para a melhora na resposta obtida, como uma boa flexibilidade e força mecânica, condutividade elétrica e um consequente aumento na área superficial, aumentando a detecção do analito alvo [74,83]. No entanto, o grafeno possui um alto custo para sua produção e processamento e uma falta de escalabilidade na sua produção, inviabilizando a produção em grandes quantidades, o que acaba restringindo o uso para modificação da superfície eletródica [74,84].

O óxido de grafeno (GO, do inglês *graphene oxide*) é um composto quimicamente modificado, formado a partir de oxidação e uma esfoliação de grafite. O GO possui uma grande quantidade de compostos oxigenados em sua estrutura, com hibridização sp^3 , o que causa um aumento na distância interplanar. O custo do GO é bem mais baixo em relação ao grafeno, e o fato de ser um material com fácil dispersão em água o torna atrativo para modificação de eletrodos pois seu manuseio é simples [85,86]. No entanto, o GO possui um transporte elétrico limitado pela funcionalização do oxigênio em sua superfície planar, tornando-o um isolante elétrico e perdendo condutividade [85]. Para contornar esse problema é possível reduzir o GO química, térmica ou eletroquimicamente, transformando-o em óxido de grafeno reduzido (rGO, do inglês *reduced graphene oxide*), que possui estrutura e propriedades similares ao grafeno [87]. A Figura 2 representa as etapas de oxidação e esfoliação do grafite e redução do GO, respectivamente.

Figura 2: Esquema de obtenção do óxido de grafeno reduzido a partir de grafite



Fonte: Reproduzido e adaptado com permissão de Wiley, de Functional composite materials based on chemically converted graphene, Bai, H., Li, C. e Shi, G., 23, 2011 [88]. Permissão concedida pela Copyright Clearance Center, Inc.

O rGO, assim como o GO, pode ser produzido em grande escala e com um baixo custo. A redução eletroquímica possui uma vantagem frente aos outros métodos de redução do GO pois esta pode ser feita diretamente na superfície do eletrodo, sendo possível controlar a quantidade de material a ser reduzido pelos parâmetros eletroquímicos escolhidos, como o controle por potencial fixo ou faixa de potencial, corrente e carga, removendo uma grande quantidade dos grupos oxigenados da estrutura e aumentando sua condutividade elétrica [84,89,90].

1.4.2 Nanopartículas metálicas

O uso de nanopartículas (NPs) metálicas em sensores eletroquímicos tem sido bastante estudado, devido a sua propriedade eletrocatalítica sobre o processo redox do analito de interesse e de condutividade elétrica, aumento da área eletroativa superficial do eletrodo, facilitando o transporte de massa e a transferência eletrônica, melhorando diretamente a resposta eletroquímica do sensor. Essas partículas estão na escala nano, variando de 1 a 100 nm [91,92]. Para a deposição de NPs é possível usar diferentes métodos, como a deposição química por vapor, em que ocorre a reação de gases precursores na superfície de um substrato, formando um filme [93], deposição por sol-gel, em que precursores metálicos formam um gel no substrato, passando por um tratamento térmico para a obtenção de nanopartículas [94], redução química com o uso de agentes redutores de íons metálicos [95], redução eletroquímica, que envolve o uso de parâmetros como potencial, corrente e tempo de deposição para a obtenção das NPs [96], entre outras. Dentre esses métodos, a deposição eletroquímica possui vantagens como o controle preciso da deposição e disposição das nanopartículas no substrato, gasto energético menor quando comparado com outros métodos e deposição em um tempo mais curto [96].

Na literatura tem sido reportado vários tipos de NPs, tais como ouro, prata, cobre, níquel, platina, ferro, rutênio e cobalto [78]. Particularmente, as AuNPs tem sido extensivamente estudada devido a facilidade de manuseio e preparo, além de possuir uma excelente condutividade elétrica e térmica, possuir uma baixa toxicidade quando comparada com outras NPs e uma boa estabilidade em uma ampla faixa de potencial elétrico e de pH. Estas representam uma

alternativa altamente viável aos eletrodos de ouro sólido, pois possui as mesmas propriedades, porém o seu custo é significativamente inferior [92,97–99].

As AuNPs foram reportadas na literatura para determinação de diferentes espécies enantioméricas, tais como o D-manitol [100], tirosina [101], enantiômeros de naproxeno, um anti-inflamatório amplamente utilizado no tratamento de doenças reumáticas [102], propranolol [103,104], tirosina e 3,4-dihidroxifenilalanina [105].

Com as excelentes propriedades e aplicações mencionadas, as AuNPs podem ser utilizadas na preparação de sensores eletroquímicos para determinação de enantiômeros, visando o aumento na detectibilidade desse dispositivo.

1.4.3 Polímeros molecularmente impresso

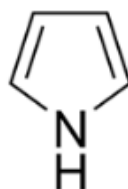
Com o intuito de tornar o sensor mais seletivo para o analito alvo, é possível modificar o eletrodo também com MIP. Sabe-se que em matrizes complexas há a presença de diversas moléculas orgânicas que pode influenciar diretamente a resposta do sensor, pois atuam como interferentes na resposta obtida, diminuindo a seletividade. Para contornar esse fato, os MIPs podem ser utilizados. Este é um material sintético capaz de reconhecer seletivamente uma molécula alvo, que é capaz de reproduzir interações seletivas como as de receptores enzima/substrato [56].

Esse material é formado por uma solução contendo um ou mais monômeros e analitos de interesse, formando um filme polimérico [106]. Posteriormente, é realizada a extração da molécula molde da matriz polimérica, visando a formação das cavidades seletivas no filme com significativa afinidade, que são complementares em tamanho, forma, dimensão, funcionalidade, apresentando capacidade enantiosseletiva ao analito de interesse [107,108], para que o alvo possa religar nesses sítios formados, superando muitas limitações dos métodos de detecção tradicionais [109].

O uso de MIPs para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos são muito atrativos na comunidade científica devido às suas vantajosas propriedades, como sua alta afinidade com diversos analitos, seletividade, estabilidade química aprimorada, facilidade de preparação, versatilidade, detectibilidade, baixo custo, baixo LD e aplicações práticas [106,109].

Na etapa de síntese do MIP é extremamente importante escolher um monômero funcional eficiente para se obter cavidades altamente seletivas. Dentre os monômeros mais utilizados na literatura pode-se citar o pirrol [57], anilina [110] e orto-fenilenodiamina [100]. O monômero pirrol (Figura 3) é capaz de formar um filme com uma alta estabilidade química e mecânica e interage facilmente com diversos substratos, além de apresentar comportamento eletroquímico bem definido, tornando-o um monômero amplamente utilizado na construção de MIPs [57], sendo polimerizado na superfície do eletrodo formando polipirrol (PPy). São relatados na literatura diferentes trabalhos usando GCE, rGO e MIP com PPy [111–113].

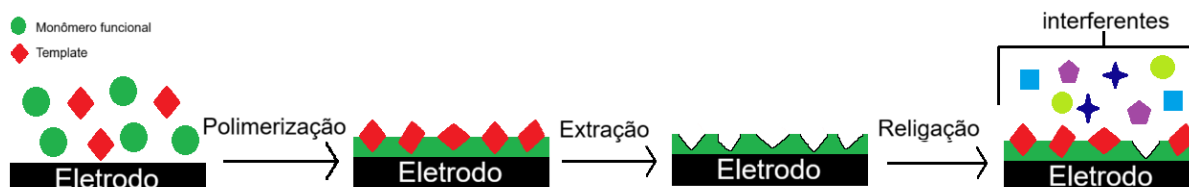
Figura 3: Estrutura molecular do pirrol.



Fonte: elaborado pelo autor.

Existem diversas formas de se fazer uma polimerização, podendo citar a polimerização em bulk, por precipitação, suspensão, sol-gel, emulsão e eletropolimerização [106,109]. A representação geral do processo de polimerização é mostrada na Figura 4. A eletropolimerização é o mais adequado pois apresenta algumas vantagens frente às outras formas de polimerização, como a possibilidade de ser feita diretamente na superfície do eletrodo, sendo possível controlar a espessura e adesão do filme aplicando parâmetros eletroquímicos e permitindo a formação de um filme fino, resultando em um procedimento simples e feito em um curto tempo [114].

Figura 4: Esquema geral para a formação de MIP.



Fonte: elaborado pelo autor.

1.4.4 Sensores para determinação de enantiômeros usando MIP

Na literatura são reportados diversos sensores eletroquímicos para determinação enantiosseletiva baseados em MIP, dentre estes a determinação do (L)-triptofano e (L)-tirosina, com LD de $2,0 \text{ nmol L}^{-1}$ e $30,0 \text{ nmol L}^{-1}$ [115], respectivamente, (D) e (L)-ácido glutâmico, feito em eletrodo de ouro e com LD de $4,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ [116], (D)- e (L)-cisteína, com LD atingindo a escala femto, 49 fmol L^{-1} e $6,0 \text{ fmol L}^{-1}$ [117] e (D)- e (L)-histidina em transistor eletroquímico orgânico, com LD de 10 nmol L^{-1} e $0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ [118]. Outros trabalhos reportados na literatura para determinação de enantiômeros estão listados na Tabela 1. No entanto, esses enantiômeros não são determinados de forma sucessiva em um mesmo sensor, sendo feita a construção de dois sensores para determinar cada enantiômero de forma separada, fazendo com que a determinação enantiomérica seja mais laboriosa.

Os isômeros (D) e (L) do limoneno são enantiômeros, e, por isso, possuem fórmula molecular e comportamento eletroquímico idênticos, entretanto, a forma estrutural da conformação espacial é diferente, formando uma imagem especular não sobreposta e fazendo com que seja possível formar cavidades molecularmente impressas que sejam seletivas para cada enantiômero [119], que podem ser determinados de forma sucessiva. Como estes possuem as mesmas características redox, a determinação dos analitos deve ser feita de forma indireta, usando uma sonda eletroquímica [120,121]. A escolha da sonda deve ser feita considerando o tipo de análise a ser feito e o substrato utilizado. O par redox ferri-ferrocianeto de potássio é muito utilizado para medir a transferência de carga pois é sensível a alterações na superfície eletródica, útil para estudo em eletrodos modificados. Além disso, essa sonda é solúvel em água, implicando uma facilidade na sua preparação, esta possui estabilidade, que torna o manuseio e o armazenamento da solução mais fácil, tem um menor custo relativo quando comparado com outras sondas reportadas, possui reação redox reversível, alternando entre os estados oxidado e reduzido do par $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ com respostas estáveis, além de frequentemente ser utilizado em trabalhos que tem GCE como substrato. Sendo assim, essa sonda é adequada para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos [122,123].

Tabela 1: Lista de trabalhos de sensores para enantiômeros reportados na literatura.

ENANTIÔMERO	MIP	ELETRODO	AMOSTRA	FAIXA LINEAR	LD	REF
Fenilalanina	Bis(bitienil)metano	EG-FET ¹	-	D/L: 13,00-100,00 µM	D/L:13,00 µM	[124]
Fenilalanine	Cloridrato de dopamina	GCE/ITO BPE ²	Soro humano	D/L: 0,0100-10000 nM	D-4,60 pM L-3,90 pM	[125]
Ácido piroglutâmico	Ácido 5-metil-2-tiofeno carboxílico	Grafite	Aquosa	D: 2,80-165,0 ng mL ⁻¹ L: 2,80-170,0 ng mL ⁻¹	D/L: 0,77 nM	[126]
Ácido aspártico	NAPD ³	Grafite	Aquosa	D: 9,98-516,25 ng mL ⁻¹ L: 9,98-532,72 ng mL ⁻¹	D-1,71 nM L-1,76 nM	[127]
Ácido aspártico	NAPD ³	Grafite	Fluído cerebrospinal	D: 9,98-522,35 ng mL ⁻¹ L: 9,98-532,72 ng mL ⁻¹	D-1,72 nM L-1,79 nM	[127]
Ácido aspártico	NAPD ³	Grafite	Aquosa	D/L: 0,10-10,00 ng mL ⁻¹	D-0,034 ng mL ⁻¹ L-0,032 ng mL ⁻¹	[128]
Ácido aspártico	NAPD ³	Grafite	Fluído cerebrospinal	D/L: 0,10-10,00 ng mL ⁻¹	D/L:0,31 ng mL ⁻¹	[128]
Ácido aspártico	Ácido 3-indolacético	Grafite	Clínico/soro sanguíneo	D: 0,15-7,40 µM L: 0,15-8,64 µM	D-25,00 nM L-16,00 nM	[129]
Metionina	Benzidine	Grafite	Aquosa	D:11,70-188,70 ng mL ⁻¹ L:11,70-206,30 ng mL ⁻¹	D/L: 3,00 ng mL ⁻¹	[130]
Metionina	Benzidine	Grafite	Fluído biológico	D/L:0,03-30,00 ng mL ⁻¹	D/L: 0,0098 ng mL ⁻¹	[131]
Tlroxina	1,3-Diacroloilureia	Ag	Soro sanguíneo	D: 0,05-15,00 ng mL ⁻¹ L: 0,06-15,00 ng mL ⁻¹	D-0,0087 ng mL ⁻¹ L-0,0088 ng mL ⁻¹	[132]
Tiroxina	1,3-Diacroloilureia	Ag	Farmacêutica	D/L: 0,06-15,00 ng mL ⁻¹	D/L: 0,0084 ng mL ⁻¹	[132]
Tlroxina	1,3-Diacroloilureia	Ag	Aquosa	D/L: 0,01-17,32 ng mL ⁻¹	D-0,0062 ng mL ⁻¹ L-0,0060 ng mL ⁻¹	[133]
Tlroxina	1,3-Diacroloilureia	Ag	Soro sanguíneo	D: 0,01-16,88 ng mL ⁻¹ L: 0,01-16,44 ng mL ⁻¹	D-0,0070 ng mL ⁻¹ L-0,0058 ng mL ⁻¹	[133]
Tlroxina	1,3-Diacroloilureia	Ag	Farmacêutica	D: 0,01-17,32 ng mL ⁻¹ L: 0,01-17,20 ng mL ⁻¹	D-0,0068 ng mL ⁻¹ L-0,0060 ng mL ⁻¹	[133]
Dihidroxifenilalanina	Tetrametoxissilano	Óxido de índio estanho	-	-	D/L: 1,00 nM	[134]
Dimetil Ferrocenil Etilamina	Tetrametoxissilano	Óxido de índio estanho	-	-	D/L: 1,00 µM	[134]
Triptofano	Pyrrole	GCE	Fluído biológico	D/L: 0,01-13,00 mM	D-9,00/L-12,00 nM	[135]
Talidomida	Bisphenol A	Microbalança de cristal de quartzo	-	D:100-10000 ng mL ⁻¹ DL:100-2000 ng mL ⁻¹	D-0,00010 ng mL ⁻¹ DL-0,00013 ng mL ⁻¹	[136]
Ácido ascórbico	Poli(ácido anilina-ferroceno sulfônico)	Grafite	Aquosa	D: 0,02-0,19 nM L: 0,02-0,18 nM	D-0,73 pM L-0,82 pM	[137]
Ácido málico	4-Gluconamidofenilmetacrilato	Microbalança de cristal de quartzo	Aquosa	D: 20,00-190,00 ng mL ⁻¹ L: 20,00-200,00 ng mL ⁻¹	D-0,21 ng mL ⁻¹ L-0,18 ng mL ⁻¹	[138]

Fonte: elaborado pelo autor.1 – EG-FET - transistor de efeito de campo de porta estendida (do inglês, *extended-gate field-effect transistor*)

2 – GCE/ITO BPE - eletrodo de carbono vítreo/óxido de índio e estanho eletrodo bipolar

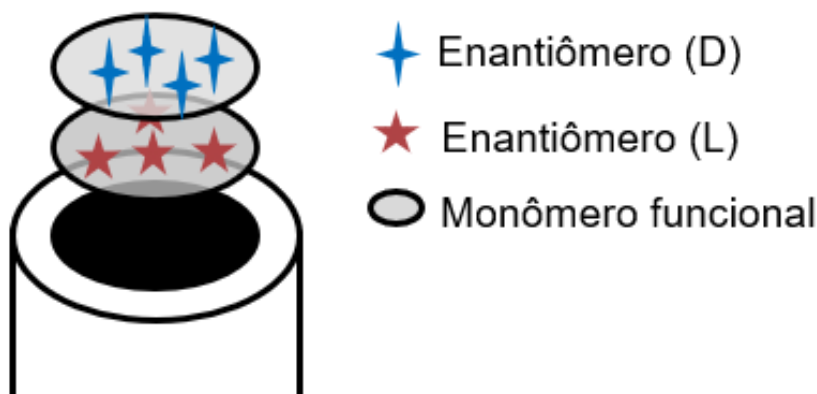
3 – NAPD - N-acrilolil-pirrolidina-2, 5-diona

Foram encontrados três trabalhos em que isômeros são determinados sucessivamente em um mesmo eletrodo. Nos trabalhos relatados foram determinados (D) e (L)-cisteína, usando uma combinação de três monômeros, ácido metacrílico, amida acrílica e N-isopropilacrilamida, com LD de $0,61 \text{ pg mL}^{-1}$ e $0,74 \text{ pg mL}^{-1}$ [139], (D) e (L)-ácido aspártico, sendo polimerizado com o monômero N-acrilóil-pirrolidina-2,5-diona (NAPD), com LD de $1,1 \text{ ng mL}^{-1}$ e $1,2 \text{ ng mL}^{-1}$ [140] e (D) e (L)-serina, usando acrilamida como monômero funcional, com LD de $0,24 \text{ ng mL}^{-1}$ e $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ [141], respectivamente.

Para a determinação de dois analitos enantioméricos usando um único eletrodo modificado com MIPs, empregando uma abordagem denominada na língua inglesa “*one-by-one*” foram encontrados dois trabalhos [139,140] e um usando a metodologia denominada “*layer-by-layer*” [141]. A determinação dos analitos é feita de forma consecutiva, em que é determinado primeiro um analito de interesse e posteriormente o seu enantiômero. Para a determinação de analitos por técnicas voltamétricas é possível fazer uma análise direta, quando o analito possui processo redox, ou seja, é eletroativo. No caso de enantiômeros, como estes possuem o mesmo comportamento eletroquímico, a determinação direta não seria possível pois o processo redox obtido seria no mesmo potencial, então é necessário o uso da sonda para calcular a variação de corrente com o intuito de diferenciar os isômeros (D) e (L) [139,140].

A metodologia “*layer-by-layer*” consiste na formação de duas camadas do filme polimérico, uma correspondente ao enantiômero (D) e a outra camada referente ao enantiômero (L) [141] (Figura 5).

Figura 5: Representação da formação de duas camadas com enantiômeros específicos pela abordagem “*layer-by-layer*” em superfície eletródica.

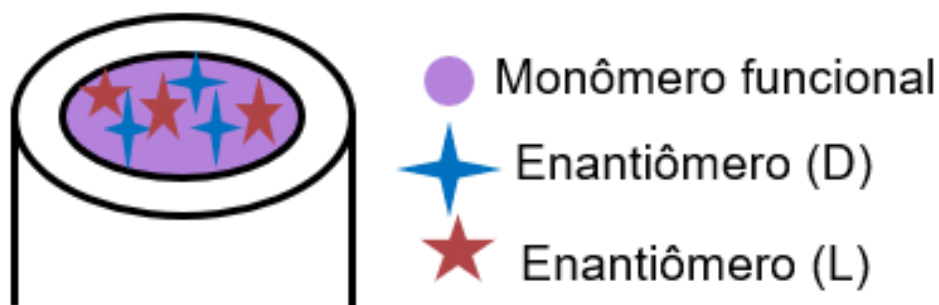


Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar de apresentar uma excelente seletividade ao analito de interesse, essa abordagem apresenta alguns obstáculos como uma construção mais demorada do eletrodo, já que possui mais etapas de otimização e de formação do filme na superfície do eletrodo, além de formar cavidades mais internas com uma maior dificuldade de acesso pelo analito de interesse e da sonda eletroquímica [139].

Para contornar esses problemas, é possível fazer a modificação do sensor com uma única camada de filme contendo os dois enantiômeros. A abordagem “one-by-one” é feita com uma solução contendo monômero e os dois analitos de interesse, formando uma matriz polimérica com os enantiômeros (D) e (L) (Figura 6). Posteriormente, é feita a extração desses analitos, formando então as cavidades complementares em tamanho, dimensão, funcionalidade e isomeria. A determinação consiste em saturar as cavidades do enantiômero (D) com o seu analito (D)-específico e fazer leituras por meio de voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *differential pulse voltammetry*) com auxílio de uma sonda eletroquímica, resultando o preenchimento total dos sítios do enantiômero (D) no filme polimérico, obtendo, então, um valor de corrente, restando somente as cavidades do enantiômero (L) livres. Essas cavidades livres são então preenchidas pelo analito (L)-específico e é feita uma nova leitura por meio de DPV, usando a sonda eletroquímica. É feita novamente a extração dos analitos, posteriormente com a saturação do (L)-específico para determinação outro enantiômero [139,140].

Figura 6: Representação da formação da camada com ambos enantiômeros pela abordagem “one-by-one” em superfície eletródica



Fonte: elaborado pelo autor.

Sendo assim, visando uma maior seletividade na construção de um sensor eletroquímico para determinação de compostos enantioméricos, torna-se adequada a construção de eletrodos baseados em MIP com modificações com nanomateriais como rGO e NPs, objetivando uma maior resposta obtida, tornando esse dispositivo com grande potencial. Além disso, ainda não foi reportado na literatura nenhum trabalho para determinação enantiosseletiva de (D) e (L)-limoneno usando sensores eletroquímicos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Construção de um sensor eletroquímico baseado em polímero molecularmente impresso com polipirrol suportado sobre óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de ouro para a determinação enantiosseletiva do (D) e (L)-Limoneno.

2.2 Objetivos específicos

- Preparação de eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro em óxido de grafeno reduzido (GCE/rGO/AuNPs);
- Eletropolimerização de pirrol na superfície do eletrodo modificado (GCE/rGO/AuNPs/MIP);
- Estudar a resposta eletroquímica dos analitos de interesse utilizando uma sonda eletroquímica;
- Otimização dos parâmetros experimentais do eletrodo a ser desenvolvido;
- Caracterização do eletrodo desenvolvido por técnicas eletroquímicas, microscópicas e espectroscópicas;
- Desenvolvimento da metodologia analítica para determinação dos enantiômeros (D) e (L) de limoneno e construção das figuras de mérito;
- Realização de estudos referente a seletividade com possíveis interferentes, estabilidade e repetibilidade;
- Aplicação do método desenvolvido em amostras reais para determinação do (D) e (L)-limoneno;
- Avaliação do sensor desenvolvido utilizando ensaios de recuperação.

3 Parte experimental

3.1 Materiais e reagentes

Os reagentes usados nesse trabalho foram todos adquiridos na Sigma-Aldrich e inclui: α -Terpineno ($C_{10}H_{16}$, 85,0%), (-)-Borneol ($C_{10}H_{18}O$, padrão analítico), (R)-(+)-Limoneno ($C_{10}H_{16}$, 97,0%), (S)-(-)-Limoneno ($C_{10}H_{16}$, 96,0%), Acetonitrila (CH_3CN , 99,8%), Ácido sulfúrico (H_2SO_4 , > 95,0%), Canfeno ($C_{10}H_{16}$, 95,0%), Cloreto de ouro (III) ($HAuCl_4$, 52,0%), Cloreto de potássio (KCl, >99,0%), Fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4 , 99,0%), Fosfato de sódio monobásico ($NaHPO_4$, 99,0%), Hexacianoferrato (III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$, 99,9%), Hidróxido de sódio (NaOH, $\geq 98,0\%$), Mirceno ($C_{10}H_{16}$, grau técnico), Óxido de grafeno ($4,0\text{ mg mL}^{-1}$, dispersão em H_2O), Pirrol (C_4H_4NH , 98,0%), Sabineno hidratado ($C_{10}H_{18}O$, padrão analítico), Sulfato de sódio (Na_2SO_4 , $\geq 99,0\%$), Valenceno ($C_{15}H_{24}$, $\geq 65,0\%$). Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (Milli-Q), com resistividade de $18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ em temperatura ambiente.

3.2 Equipamentos

Voltametria cíclica (CV, do inglês *cyclic voltammetry*), DPV e cronoamperometria foram realizadas em um potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT302, enquanto as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*) para caracterização do eletrodo foram realizadas em um potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT204, com todas as medidas controladas pelo software Nova 2.1.

A célula eletroquímica é composta de uma célula padrão de três eletrodos, com eletrodo de prata/cloreto de prata ($Ag/AgCl\ 3,0\text{ mol L}^{-1}\text{ KCl}$), platina (Pt) e GCE com diâmetro de 3,0 mm, como eletrodos de referência, auxiliar e de trabalho, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente.

A caracterização morfológica da superfície eletródica foi realizada usando microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *scanning electron microscopy*), em um microscópio eletrônico de duplo feixe Helios Nanolab 600i, acoplado a um módulo da Thermo Scientific, de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS, do inglês *energy dispersive X-ray spectroscopy*).

Para a identificação de ligações químicas e grupos funcionais foi feita a caracterização espectroscópica de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS, do inglês *X-ray photoelectron spectroscopy*), utilizando um espectrômetro comercial UNI-SPECS UHV System com pressão menor que $5,0 \times 10^{-7}$ Pa. A linha $MgK\alpha$ foi utilizada ($h\nu = 1254,6$ eV) como fonte de ionização e a energia de passagem do analisador foi ajustada para 10 eV. O ruído inelástico dos espectros de alta resolução foi subtraído utilizando o método de Shirley. A composição foi determinada pelas proporções relativas das áreas de picos corrigidas pelos fatores de sensibilidade atômica de Scofield com uma precisão de $\pm 5\%$. Os espectros foram deconvoluídos utilizando uma função do tipo Voigtiana, com combinações Gaussianas (70%) e Lorentzianas (30%). A largura do pico à meia altura variou entre 1,3 e 2,1 eV, e a posição dos picos foi determinada com uma precisão de $\pm 0,1$ eV.

3.3 Limpeza do GCE

O procedimento de limpeza da superfície do GCE foi um polimento mecânico em tecido de feltro usando pó de alumina ($0,3 \mu m$). Posteriormente, foi feita uma medida usando CV em uma faixa de potencial que variou de -0,2 V a 0,6 V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em sonda eletroquímica de $K_3[Fe(CN)_6]$ de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até verificar característica de uma voltametria estável, indicando uma superfície limpa de GCE e livre de substâncias adsorvidas.

3.4 Eletrodeposição de rGO

O GCE foi modificado com GO e reduzido diretamente na superfície do eletrodo usando técnica já estudada previamente pelo grupo [57,100,111,142]. Uma solução aquosa de GO $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foi diluída em Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, resultando em uma concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Após isso, o GCE foi modificado com GO e foi seco à temperatura ambiente. Posteriormente, foi usada uma solução de Na_2SO_4 em concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e, com a técnica de CV, em uma faixa de potencial de -0,2 a -1,5 V foi feita redução diretamente na superfície do eletrodo, formando então o GCE/rGO.

3.5 Modificação com nanopartículas de ouro

Após formação GCE/rGO, o eletrodo foi imerso em solução de AuNPs, composta com $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 e HAuCl_4 $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ [100,143], usando cronoamperometria, com um potencial fixo de 0,7 V aplicado até ser atingida a carga de 1,0 mC, para deposição das nanopartículas metálicas de ouro, obtendo o eletrodo GCE/rGO/AuNPs.

3.6 Preparação do filme polimérico molecularmente impresso

O próximo passo na construção do eletrodo envolveu a formação do filme polimérico usando uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 com pirrol $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, como monômero, (D)-limoneno $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (L)-limoneno $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ como moléculas molde. O limoneno, por não ser tão solúvel em água, foi inicialmente diluído em acetonitrila para uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para posteriormente ser diluído na solução de eletropolimerização. Para a eletropolimerização, foi usada uma faixa de potencial de 0,0V a 1,0V usando a técnica de CV por 5 ciclos consecutivos, em velocidade de varredura de $20,0 \text{ mV s}^{-1}$, resultando na formação do eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP.

Para a formação de cavidades seletivas do (D) e (L)-limoneno, o eletrodo foi imerso em uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e a matriz polimérica foi superoxidada em técnica de CV por 5 ciclos consecutivos, em uma faixa de potencial de 0,0V a 1,5V, em uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . O filme de polímero não impresso (NIP, do inglês *non-imprinted polymer*) também foi obtido sob as mesmas condições experimentais, mas na ausência das moléculas molde, funcionando como um branco e com o intuito de comparação na confiabilidade das medidas realizadas.

3.7 Medidas eletroquímicas

Após formação das cavidades seletivas no eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP é feita a determinação do analito pela metodologia “one-by-one” que consiste em inicialmente saturar as cavidades do enantiômero (D) com o seu analito (D)-específico e fazer leituras por meio de DPV com auxílio de uma sonda eletroquímica, até não ser mais observada uma alteração no sinal eletroquímico, que é resultante do preenchimento total dos sítios do enantiômero (D) no filme polimérico, obtendo, então, um valor de corrente (I_1), restando somente as

cavidades do enantiômero (L) livres. Essas cavidades livres são então preenchidas pelo analito (L)-específico e é feita uma nova leitura por meio de DPV (I_2), usando a sonda eletroquímica de ferricianeto de potássio $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Conforme as cavidades são preenchidas consequentemente diminui a quantidade de sítios livres para a sonda eletroquímica acessar a superfície do eletrodo, fazendo com que a corrente obtida diminua. A variação de corrente calculada ($\Delta I = I_1 - I_2$) é usada para avaliar a concentração de (L). O eletrodo passa então pelo processo de extração dos dois analitos novamente e o mesmo procedimento é feito para determinar o enantiômero (D), porém saturando inicialmente as cavidades correspondentes ao isômero (L) e fazendo o mesmo cálculo para obtenção da concentração de (D)-limoneno [139,140]. Essa abordagem de determinação é indireta devido à necessidade do uso de sonda eletroquímica, necessária para diferenciar os enantiômeros (D) e (L)-limoneno, não sendo possível fazer diretamente pois não são moléculas eletroativas, ou seja, não possuem pico de oxidação/redução.

Foram feitos voltamogramas cíclicos em um intervalo de potencial de -0,2 V a 0,6 V em velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} e DPV na faixa de potencial de -0,2 V a 0,6 V, com amplitude de potencial de pulso de 50 mV, tempo de duração de pulso de 50 ms e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . Para a EIS, a análise foi feita aplicando um potencial de 0,22 V, em uma faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, com amplitude de 0,01 V_{RMS} .

As figuras de mérito como LD, limite de quantificação (LQ) e sensibilidade amperométrica (SA) foram obtidas por meio da construção da metodologia analítica desenvolvida para o (D) e (L)-limoneno, em relação às variações de corrente obtidas na etapa de religação vs as concentração adicionadas de cada analito. Os cálculos realizados foram $LD = \frac{3SD}{S}$ e $LQ = \frac{10SD}{S}$, sendo SD o desvio padrão do intercepto (do inglês, *standard deviation*) e S a inclinação da curva de calibração (do inglês, *slope*).

3.8 Determinação de (D) e (L)-limoneno em amostra real

Os óleos essenciais de laranja (*Citrus sinensis*) e de pinho (*Abies sibirica*) foram adquiridos de uma loja em Araraquara – SP. Ambos os óleos foram diluídos em acetonitrila e posteriormente diluídos em tampão fosfato pH 7, com

o intuito de obter uma concentração adequada ao método analítico desenvolvido. A determinação foi realizada usando o método de adição de padrão tanto para o enantiômero (D) quanto o enantiômero (L), e os testes de recuperação foram feitos adicionando concentrações conhecidas dos analitos de interesse às amostras para a avaliação do método proposto.

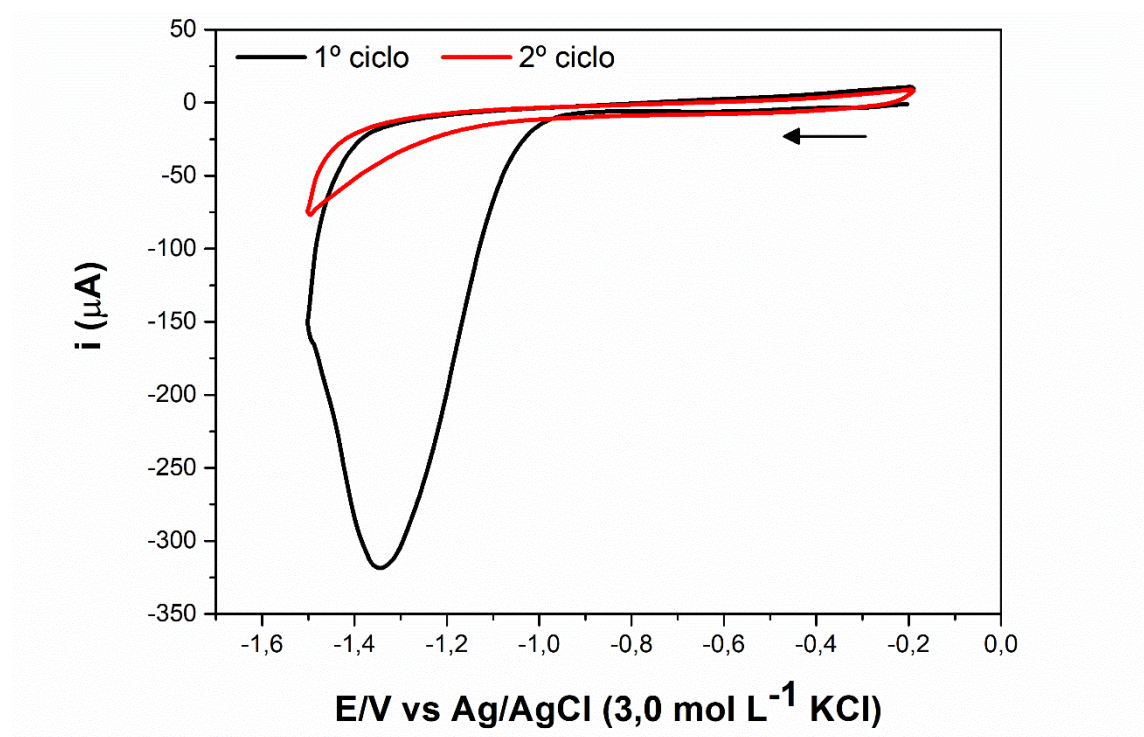
4 Resultados e discussão

4.1 Construção do eletrodo modificado

4.1.1 Comportamento rGO

Foi feito inicialmente um estudo para analisar o comportamento do GO, envolvendo uma varredura exploratória em CV em um intervalo de potencial de -0,2 V a -1,5 V em solução de GO, com o intuito de verificar o potencial de redução para se obter rGO (Figura 7). Observa-se que essa redução ocorre em aproximadamente -1,4 V, sendo que essa faixa de potencial foi escolhida para realizar a redução do nanomaterial diretamente na superfície do eletrodo. Nessa etapa ocorre a redução dos grupos oxigenados do GO, restaurando a hibridização sp^2 semelhantes às do grafeno, o que atribui características de ganho de condutividade elétrica. Além disso, observa-se um aumento da área superficial do eletrodo, que é uma propriedade do nanomaterial. Nota-se que no primeiro ciclo ocorre a redução completa do nanomaterial pois no segundo ciclo não é observado nenhum pico catódico, sendo que um ciclo é o suficiente para realizar a redução de GO nessa etapa, formando o GCE/rGO.

Figura 7: Voltamograma cíclico para GCE em solução de $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ de GO em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

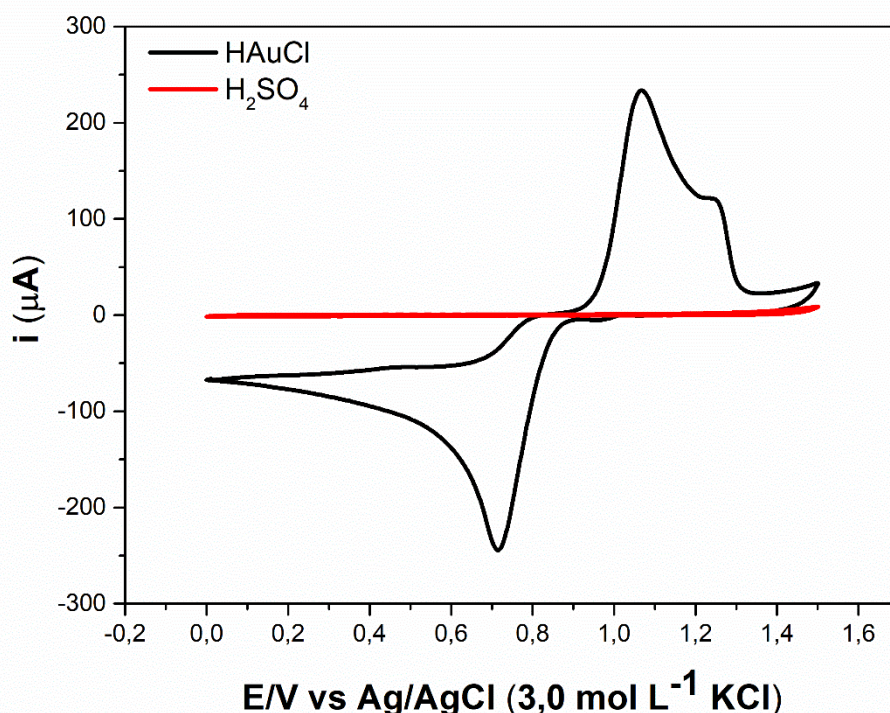


Fonte: elaborado pelo autor.

4.1.2 Comportamento das AuNPs

Com o intuito de aumentar a resposta obtida através de aumento da área eletroativa superficial do eletrodo, este foi modificado também com AuNPs. Na segunda etapa de construção do sensor eletroquímico foi realizado um estudo prévio das AuNPs. Assim, uma solução contendo $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HAuCl_4 em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi empregada para a avaliação das espécies de ouro bem como seus respectivos potenciais de redução/oxidação na faixa de potencial de 0,0 V a 1,5 V em CV, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , conforme é indicado na Figura 8.

Figura 8: Estudo do perfil eletroquímico de ouro sobre GCE usando solução de HAuCl_4 $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

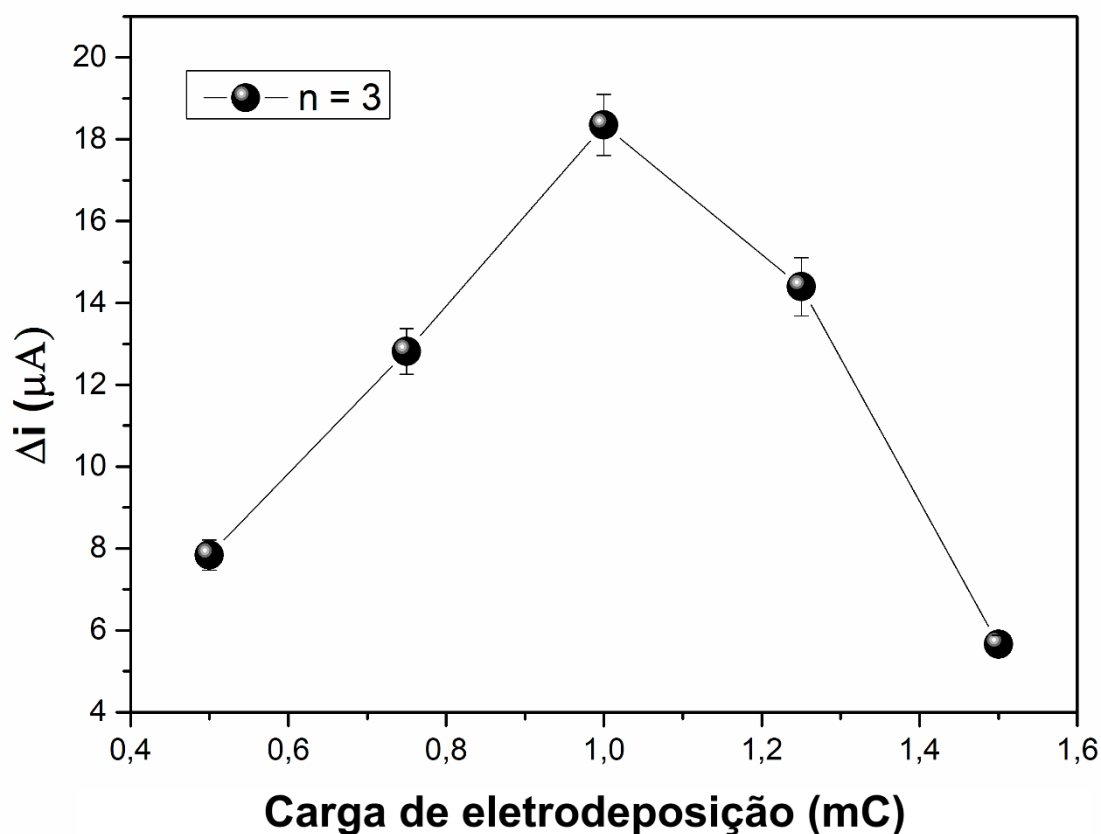


Fonte: elaborado pelo autor.

É possível observar um pico catódico em torno de 0,70 V devido à redução das espécies para ouro metálico (Au^0), e picos anódicos em 1,1 V e 1,2 V pelas espécies oxidadas do ouro Au(II) e Au(III) , respectivamente [144,145]. É fixado então o potencial de 0,70 V para eletrodeposição das nanopartículas em estado metálico, usando cronoamperometria até atingir uma carga de $1,0 \times 10^{-3} \text{ C}$. O perfil voltamétrico mostrado é típico de ouro, o que confirma a deposição da espécie reduzida na superfície do eletrodo [145,146], aumentando a área

eletroativa do eletrodo e formando o GCE/rGO/AuNPs. A carga de eletrodeposição das AuNPs foi otimizada avaliando a variação de corrente usando sonda eletroquímica de ferricianeto de potássio $K_3[Fe(CN)_6]$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 9. Percebe-se um aumento de corrente proporcional à carga aplicada até o valor de $1,0 \text{ mC}$. Após atingir este valor, a intensidade de sinal decresce significativamente até $1,5 \text{ mC}$. Dessa forma, a carga de $1,0 \text{ mC}$ foi considerada ótima e fixada para a eletrodeposição da AuNPs, por apresentar maior intensidade de corrente. A diminuição da intensidade de corrente após atingir o valor de $1,0 \text{ mC}$ indica que o eletrodo atingiu a saturação na superfície, pois teve um aumento da difusão radial que impacta diretamente o desempenho do sensor, pois as NPs não estão distribuídas de maneira uniforme na superfície e não há aumento proporcional da corrente, o que reduz a eficiência da transferência de carga [147–149].

Figura 9: Variação da corrente em função de diferentes valores de cargas aplicadas em superfície de GCE/rGO em solução de $HAuCl_4$ $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

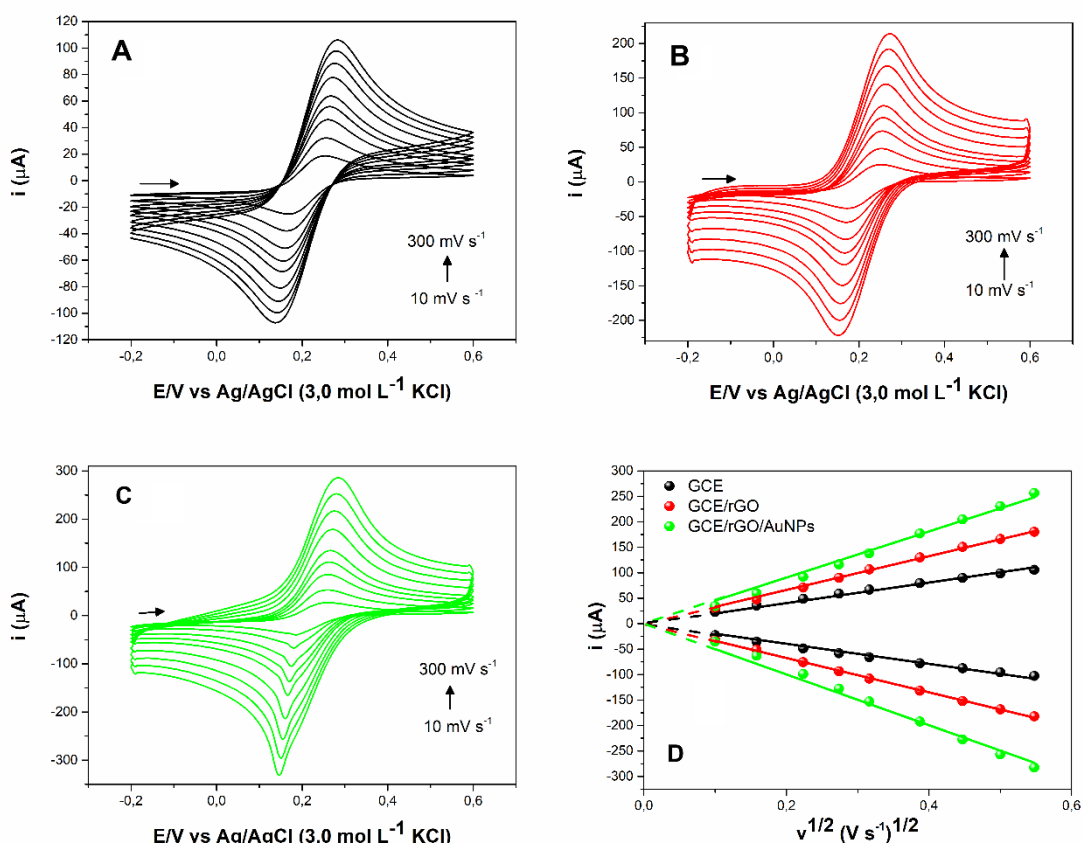


Fonte: elaborado pelo autor.

4.1.3 Determinação da área eletroativa

Com o intuito de evidenciar a propriedade de aumento de área eletroativa do eletrodo ao modificá-lo com nanomateriais de carbono e ouro, foi feito um estudo de velocidade de varredura usando o par redox da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ para o GCE, GCE/rGO e GCE/rGO/AuNPs, em diferentes velocidades de varredura (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 mV s^{-1}) (Figura 10).

Figura 10: Voltamogramas cíclicos do estudo de diferentes velocidades de varredura entre 10 e 300 mV s^{-1} em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de A) GCE, B) GCE/rGO, C) GCE/rGO/AuNPs e D) relação linear entre a corrente (i) e raiz quadrada da velocidade.



Fonte: elaborado pelo autor.

Foram calculados os parâmetros voltamétricos usando a equação de Randles–Ševčík [150] (Equação 1):

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} v^{1/2} C \text{ (Equação 1)}$$

Em que I_p corresponde à corrente de pico (A), que para o cálculo foi utilizado o valor de corrente do pico anódico de cada voltamograma, n o número de elétrons envolvido na reação, A representa a área eletroativa da superfície do

eletrodo (cm^2), D_0 o coeficiente de difusão da solução ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), v está relacionado com a velocidade de varredura (V s^{-1}) e C é a concentração da espécie (mol cm^{-3}) [150]. Para a sonda utilizada, os valores conhecidos do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ são: o número de elétrons envolvido na reação, igual a 1, coeficiente de difusão é $7,63 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ [151] e a concentração da espécie utilizada foi $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$. Reorganizando a equação e sabendo que o coeficiente angular (*slope*) de cada reta obtida é a relação $\frac{I_p}{v^{1/2}}$, é possível obter a área eletroativa do eletrodo, pela Equação 2 [150]:

$$A = \frac{\text{slope}}{(2,69 \times 10^5) n^{3/2} D_0^{1/2} C} \text{ (Equação 2)}$$

Substituindo os valores mencionados acima e os valores encontrados de coeficiente angular para cada eletrodo, obtém-se os seguintes valores de área eletroativa (Tabela 2):

Tabela 2: Parâmetros voltamétricos calculados para GCE, GCE/rGO e GCE/rGO/AuNPs.

Eletrodo	Coeficiente angular ($\times 10^{-4}$)	Área eletroativa (cm^2)
GCE	2,02	0,054
GCE/rGO	2,31	0,089
GCE/rGO/AuNPs	4,53	0,12

Fonte: elaborado pelo autor.

Analisando a Tabela 1, é possível verificar que após a modificação do GCE com rGO houve um aumento da área eletroativa em 164% do valor inicial, o que contribui diretamente para o ganho de corrente observado nos voltamogramas da Figura 10B. Além disso, é possível observar que após a modificação do eletrodo GCE/rGO com AuNPs houve mais um ganho de área de 137%. Com isso, conclui-se que as modificações com nanomateriais auxiliam diretamente no aumento da área eletroativa do sensor, corroborando para uma melhora na resposta obtida.

4.1.4 Estudo do monômero funcional

A escolha do monômero funcional para a formação do filme polimérico é uma etapa essencial, pois é necessário a formação de um filme fino, compatível com o analito de interesse, que seja reprodutível e com boa seletividade. Para isso, foram estudados três diferentes monômeros, visando uma melhor formação de cavidades seletivas para os enantiômeros: anilina, orto-fenilenodiamina e pirrol (Py, do inglês *pyrrole*), monômeros muito reportados na literatura pela sua grande compatibilidade com diversas moléculas e estabilidade na formação de filmes [100,110,111]. Com isso, foi estudada a variação de corrente obtida em sonda eletroquímica de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, usando a técnica de DPV após a extração e religações dos enantiômeros (D) e (L)-limoneno.

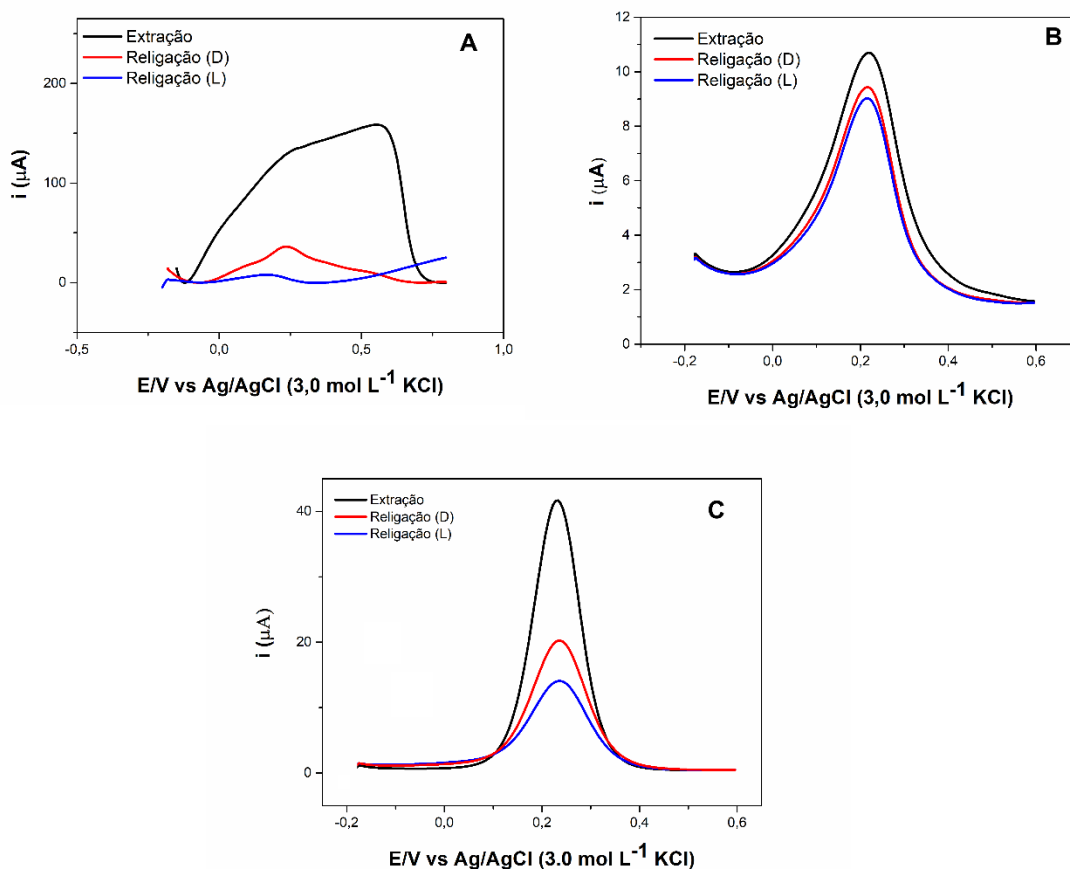
Para a formação do filme de polianilina, foi usada uma solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de anilina e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cada enantiômero, usando CV para a eletropolimerização, em uma faixa de potencial de 0,2V a 1,0V com ciclos consecutivos. A extração foi realizada usando uma solução com 9,0 mL de acetonitrila em 1,0 mL de ácido acético, durante 20 minutos [110]. Na construção do sensor com filme polimérico de orto-fenilenodiamina foi usada solução de tampão acetato com pH 4,8, $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de orto-fenilenodiamina e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de (D) e (L)-limoneno, usando CV em uma faixa de potencial de -0,4V a 1,0V com 10 ciclos. A extração foi realizada usando solução de etanol 50% durante 5 minutos [152]. Para o Py foi feita uma solução com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de monômero com $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cada enantiômero de limoneno em tampão fosfato pH 7,0. A eletropolimerização foi feita na faixa de potencial de 0,0V a 1,0V, com 10 ciclos voltamétricos. A extração também foi realizada usando CV com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com 3 ciclos [57].

Analisando Figura 11A, correspondente a DPV dos processos de extração e religação dos dois analitos do eletrodo com filme de anilina, nota-se que o perfil voltamétrico e os picos não estão bem definidos, resultando em uma resposta eletroquímica insatisfatória. Já na Figura 11B, relacionada à formação do filme de orto-fenilenodiamina, os picos voltamétricos estão bem definidos, porém o uso desse monômero não apresentou melhor seletividade para os enantiômeros, considerando que a variação de corrente obtida foi menor. Ao avaliar a Figura

11C, que representa a formação do filme polimérico com PPy, verifica-se que foi obtida a melhor resposta entre os três monômeros estudados, pois apresentou pico característico de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ bem definidos e melhor seletividade, pois houve uma variação considerável de corrente e de variação entre o (D) e (L)-limoneno em comparação com os outros monômeros, facilitando a diferenciação entre os enantiômeros.

Com isso, para a construção do sensor e visando a melhor resposta obtida, o sensor foi modificado com rGO e AuNPs para aumento da área eletroativa e o filme polimérico foi formado com pirrol, por apresentar uma melhor resposta e seletividade em relação a outros compostos estudados como monômeros funcionais.

Figura 11: Estudo do monômero funcional escolhido para a formação do filme polimérico em sonda eletroquímica de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com A) anilina $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; B) orto-fenilenodiamina $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 5; C) pirrol $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7.

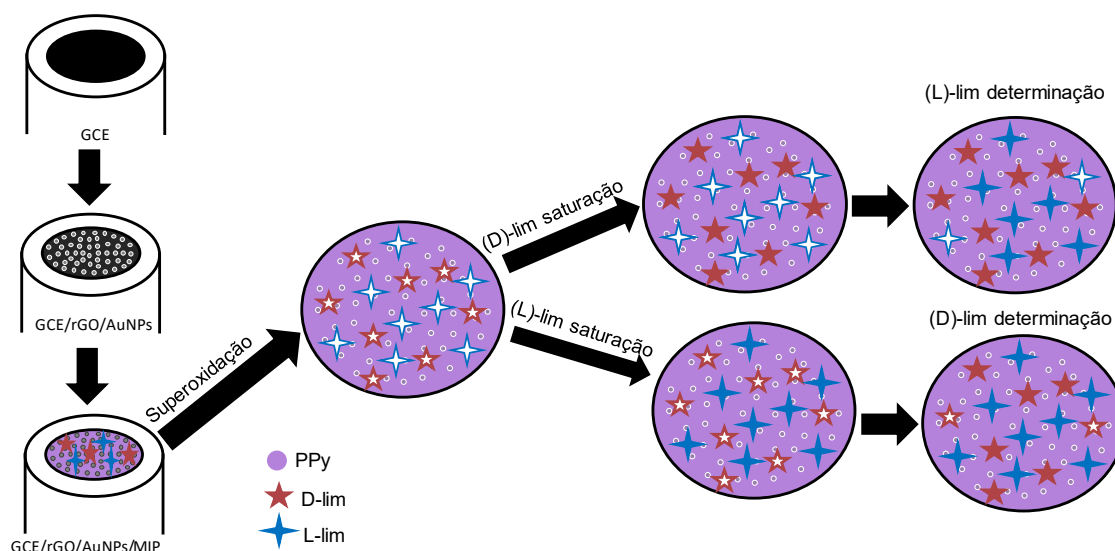


Fonte: elaborado pelo autor.

4.2 Construção do sensor eletroquímico

Nesta seção estão reportadas as etapas do desenvolvimento do sensor eletroquímico modificado com rGO, AuNPs e MIP de PPy para quantificação enantiosseletiva de (D) e (L)-limoneno, que envolve a otimização de diferentes parâmetros visando maximizar a resposta analítica do sensor, corroborando para obtenção de uma maior quantidade de cavidades seletivas para a detecção do analito. Foram feitas também as caracterizações eletroquímica, morfológica e espectroscópica, além do desenvolvimento de metodologia analítica. As etapas de preparação do sensor proposto estão representadas pela Figura 12.

Figura 12: Esquema das etapas de construção do sensor GCE/rGO/AuNPs/MIP para determinação enantiosseletiva de limoneno



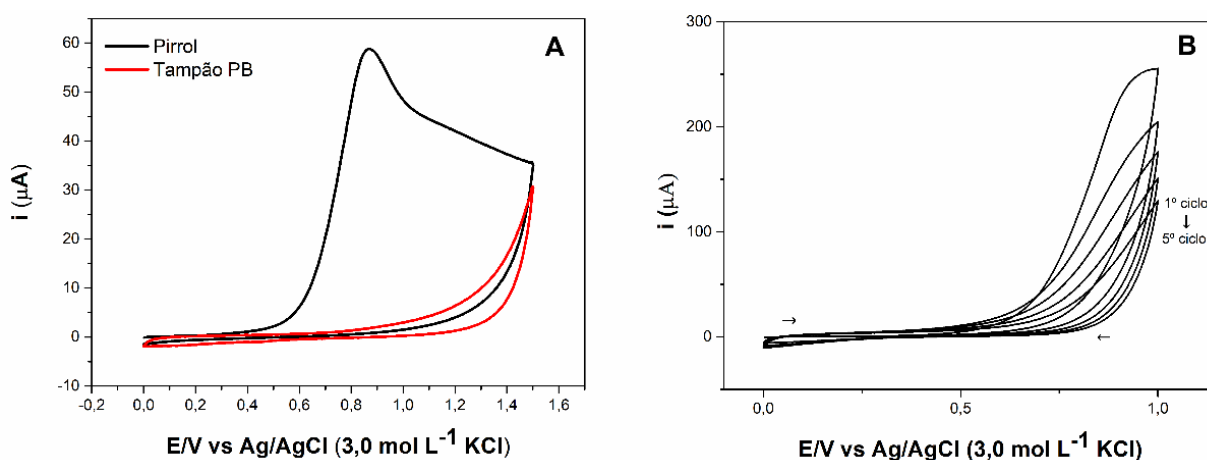
Fonte: elaborado pelo autor.

4.2.1 Eletropolimerização de PPy em GCE/rGO/AuNPs

O eletrodo GCE/rGO/AuNPs foi imerso em uma solução de Py $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 com (D)-limoneno $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e (L)-limoneno também $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Foi realizada a eletropolimerização do filme na superfície do eletrodo usando CV, com velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹ por 5 ciclos sucessivos em uma faixa de potencial de 0,0 V a 1,0 V, faixa escolhida baseada no pico anódico obtido em aproximadamente 0,87 V do perfil eletroquímico característico do pirrol, conforme indicado na Figura 13A. Analisando a Figura 13B, é possível notar que há um decréscimo de corrente conforme aumenta o número de ciclos, fato que está relacionado com o

recobrimento da superfície eletródica pela formação do filme eletrossintetizado. As moléculas de (D) e (L)-limoneno são aprisionadas na estrutura polimérica de PPy para a formação de cavidades impressas seletivas. Foi então formado o GCE/rGO/AuNPs/MIP.

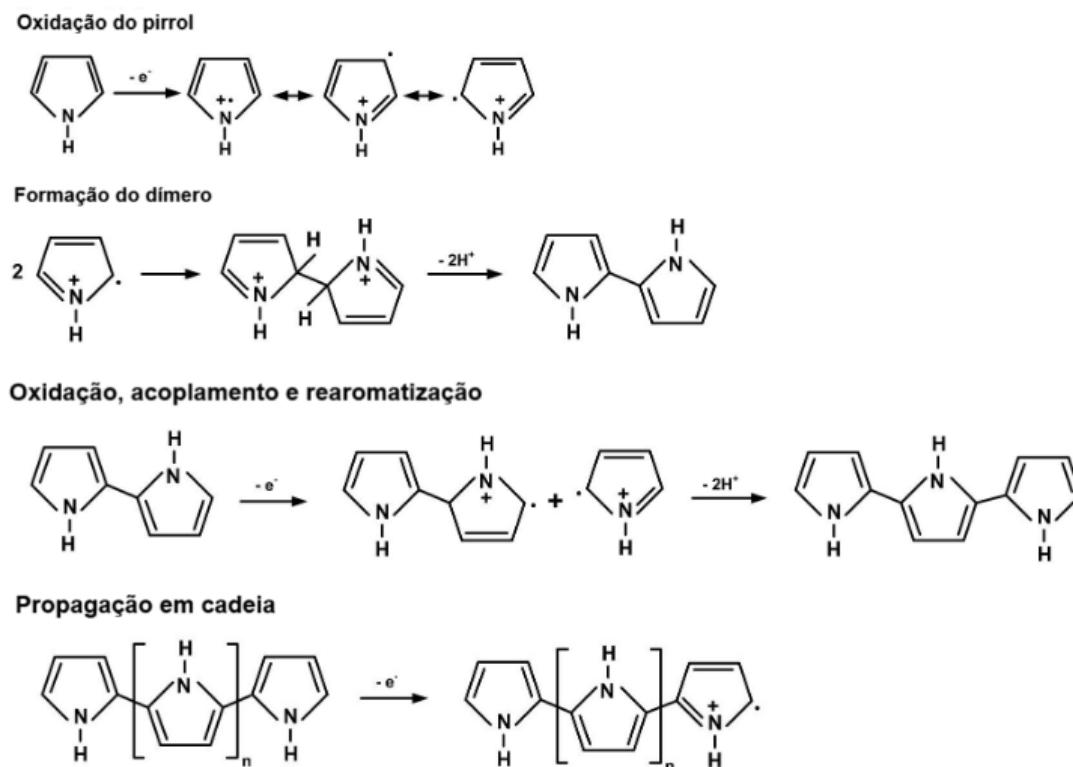
Figura 13: Voltamogramas cíclicos de A) Pirrol $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH 7,0, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e tampão fosfato, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} ; B) eletropolimerização de pirrol na superfície do GCE/rGO/AuNPs no intervalo de potencial de 0,0V a 1,0V, por 5 ciclos em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) contendo $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de (D)-limoneno e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de (L)-limoneno, com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .



Fonte: elaborado pelo autor.

O pico anódico observado em aproximadamente em 0,9V da Figura13B é atribuído à oxidação do Py, sendo que a oxidação desse monômero resulta na perda de um elétron e levando à formação de um cátion radical primário (Py^+), que se une a outro radical para a formação de uma cadeia de PPy, para desencadear a etapa de eletropolimerização sobre a superfície eletródica, que está representado na Figura 14 [153].

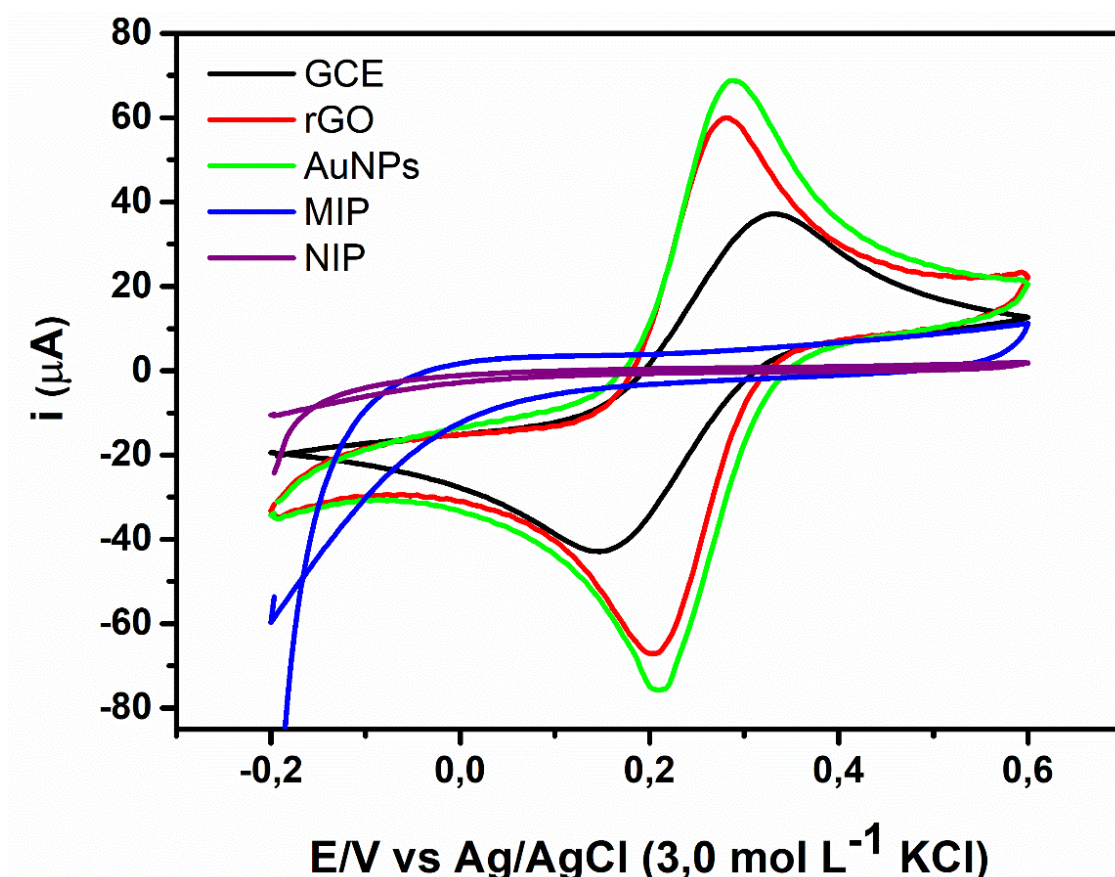
Figura 14: Mecanismo de eletropolimerização do PPy.



Fonte: Reproduzido e adaptado de Gvozdenović *et al* [153]. Reproduzido sob política de acesso aberto, Association of Chemical Engineers of Serbia, Copyright 2014.

Nessa etapa foi feita a caracterização eletroquímica por técnica de CV para visualizar as etapas de construção do sensor, conforme mostra a Figura 15, usando uma solução contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. Estão presentes os voltamogramas das seguintes etapas: o eletrodo limpo (GCE); a eletrodeposição do rGO (GCE/rGO), em que se nota um aumento do pico em relação ao GCE, comprovando o aumento da condutividade do eletrodo quando modificado com esse nanomaterial; eletrodeposição das AuNPs (CGE/rGO/AuNPs), observando novamente um aumento do pico de corrente; eletropolimerização do PPy (GCE/rGO/AuNPs/MIP), apresentando uma queda de corrente e indicando que o filme recobriu o eletrodo e bloqueou a sua superfície, impedindo a transferência eletrônica; e perfil do NIP, verificando que não existe diferença significativa em comparação com o MIP, somente uma diferença da corrente capacitiva.

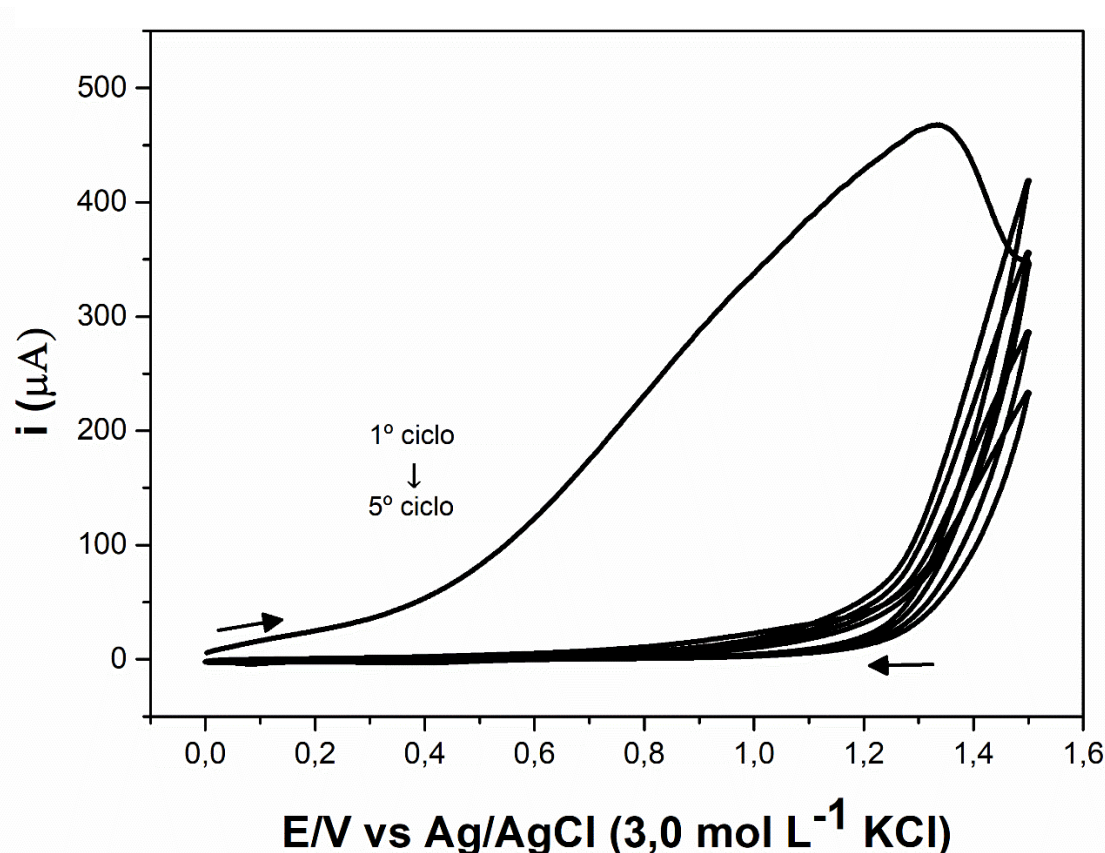
Figura 15: Voltamogramas cíclicos para GCE, GCE/rGO, GCE/rGO/AuNPs, GCE/rGO/AuNPs/MIP e GCE/rGO/AuNPs/NIP. As medidas foram realizadas em solução de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na faixa de potencial de $-0,2 \text{ V}$ a $0,6 \text{ V}$ (50 mV s^{-1}).



Fonte: elaborado pelo autor.

Foi usada uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para a superoxidação do PPy, usando 5 ciclos sucessivos em CV na faixa de potencial $0,0 \text{ V}$ a $1,5 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , com o intuito de remover os analitos da matriz polimérica e formar as cavidades seletivas para posterior reconhecimento do alvo de interesse, com perfil de oxidação indicado pela Figura 16. Observa-se um pico anódico formado em $1,3 \text{ V}$, atribuído à superoxidação do PPy que ocorre facilmente na presença de um nucleófilo forte, devido à inserção de grupos carbonila na estrutura do filme e à perda da carga positiva de Py^+ [154,155], facilitando a extração dos enantiômeros de limoneno na matriz polimérica, formando então as cavidades. Nota-se que após o primeiro ciclo há um decréscimo na corrente, relacionado com a perda de condutividade de PPy [57].

Figura 16: CV para superoxidação do GCE/rGO/AuNPs/MIP durante 5 ciclos em NaOH 0,1 mol L⁻¹, velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, no intervalo de 0 V a 1,5 V.



Fonte: elaborado pelo autor.

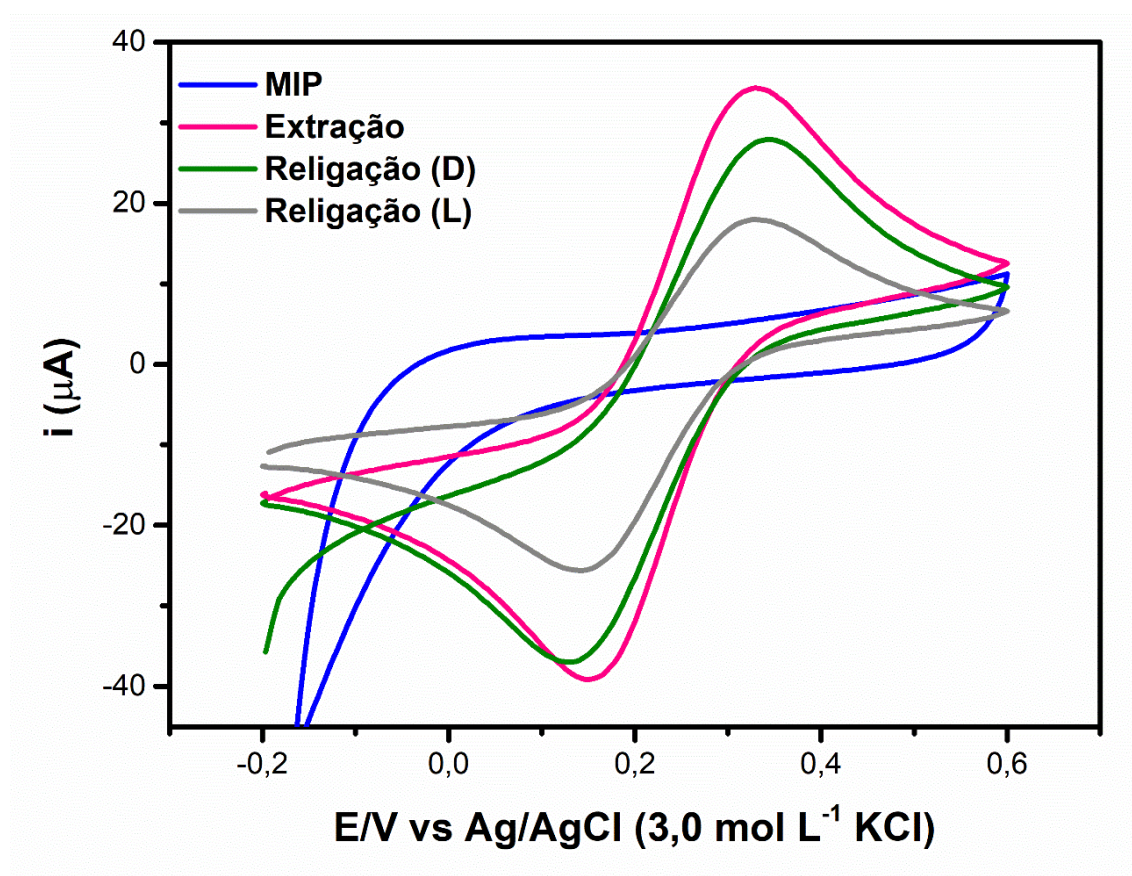
4.2.2 Processo de religação

Nas etapas de religação, foi feita inicialmente uma saturação do enantiômero (D)-limoneno $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7, durante 5 minutos sob baixa agitação com o intuito de religar os analitos nos sítios desse enantiômero e garantir a saturação das cavidades, sendo feita uma varredura em DPV para avaliar a corrente obtida. Posteriormente o eletrodo foi imerso em solução do outro isômero, (L)-limoneno, $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7 durante 5 minutos sob agitação, sendo feita novamente uma varredura em DPV e calculando então a variação de corrente e fazendo a determinação do (L)-limoneno pelo método de análise *one-by-one* [139,140]. Para padronização, é feito primeiro a saturação com o (D)-limoneno, no entanto é obtida a mesma resposta se a saturação for feita com o outro enantiômero inicialmente. Quando ocorre a religação dos analitos há uma queda na corrente obtida do par redox de

ferricianeto de potássio, devido a indisponibilidade dos sítios para a sonda atingir a superfície do eletrodo, e com isso é possível calcular a variação de corrente obtida entre uma religação e outra. Após esse processo, para a determinação do enantiômero (D), é feita novamente o processo de extração no mesmo eletrodo, para remover os analitos da matriz polimérica e então é feita a saturação do (L)-limoneno ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7) durante 5 minutos e a posterior determinação do (D)-limoneno ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7), pelo mesmo procedimento reportado anteriormente.

Para monitorar as etapas após a formação do filme polimérico, foi feita a caracterização do eletrodo usando a sonda eletroquímica em técnica de CV (Figura 17).

Figura 17: Voltamogramas cíclicos para GCE/rGO/AuNPs/MIP antes da extração, após a extração e após as religações do (D) e (L)-limoneno. As medidas foram realizadas em solução de concentração $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e KCl 0,1 mol L⁻¹, na faixa de potencial de -0,2 V a 0,6 V (50 mV s^{-1}).



Fonte: elaborado pelo autor.

Na formação do filme não é possível observar picos pois este está recobrendo toda a superfície do eletrodo, porém, após o processo de extração e a formação das cavidades seletivas, nota-se que há um ganho de corrente no voltamograma ocasionado pela sonda atingindo a superfície eletródica pelos sítios formados. Posteriormente, após a saturação do (D)-limoneno ocorre um decréscimo na intensidade de corrente, o que confirma a formação de cavidades, mostrando que estas foram preenchidas parcialmente e que a sonda sofre um bloqueio ao atingir a superfície pelas cavidades. Após a religação com o (L)-limoneno, ocorre novamente mais uma queda na corrente pelo bloqueio da sonda de atingir a superfície, que indica que ainda havia cavidades disponíveis para serem preenchidas. Isso se dá, pois, as cavidades formadas são seletivas para cada enantiômero, então o (D)-limoneno não preencheu todas os sítios formados inicialmente mesmo estando em uma concentração mais alta que o outro enantiômero, devido à alta seletividade dos MIPs.

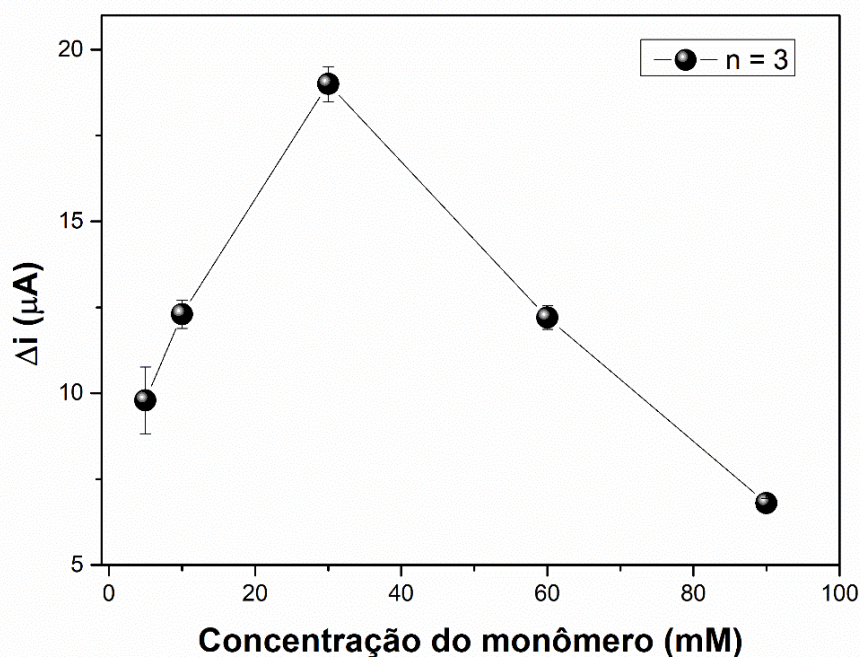
4.2.3 Otimização de parâmetros da construção do eletrodo

A otimização de parâmetros que influenciam na construção do sensor é uma etapa essencial no seu desenvolvimento, pois afetam diretamente o desempenho analítico. Estes parâmetros influenciam diretamente na espessura e estabilidade física do MIP, corroborando para obtenção de uma maior seletividade para a detecção dos analitos de interesse. Foram otimizados parâmetros como o número de ciclos voltamétricos de eletropolimerização, a concentração do monômero funcional, pH de eletropolimerização, quantidade de ciclos de extração e o tempo de religação. Ressalta-se que todos os parâmetros mencionados foram investigados via DPV avaliando a variação de corrente obtida empregando uma sonda eletroquímica de $K_3[Fe(CN)_6]$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. Assim, a eficiência do sensor GCE/rGO/AuNPs/MIP foi avaliada por meio da variação de corrente da sonda antes e depois da religação das moléculas de limoneno às cavidades formadas no filme polimérico, escolhendo os valores que apresentaram uma maior variação, que está relacionado com a melhor condição do sensor.

4.2.3.1 Efeito da concentração do monômero funcional

A concentração do monômero e da molécula molde influenciam diretamente na espessura do filme polimérico no processo de eletropolimerização e a consequente formação das cavidades seletivas. Logo, na fase de otimização da concentração, a concentração de analitos foi fixada em $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cada isômero, enquanto a concentração de Py foi variada na faixa de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $9,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. É possível observar (Figura 18) que a resposta máxima do sensor é alcançada na concentração de $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 18: Variação de corrente obtida no estudo da influência da concentração de Py durante a eletropolimerização do MIP, monitorado por DPV e sonda eletroquímica de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl.



Fonte: elaborado pelo autor.

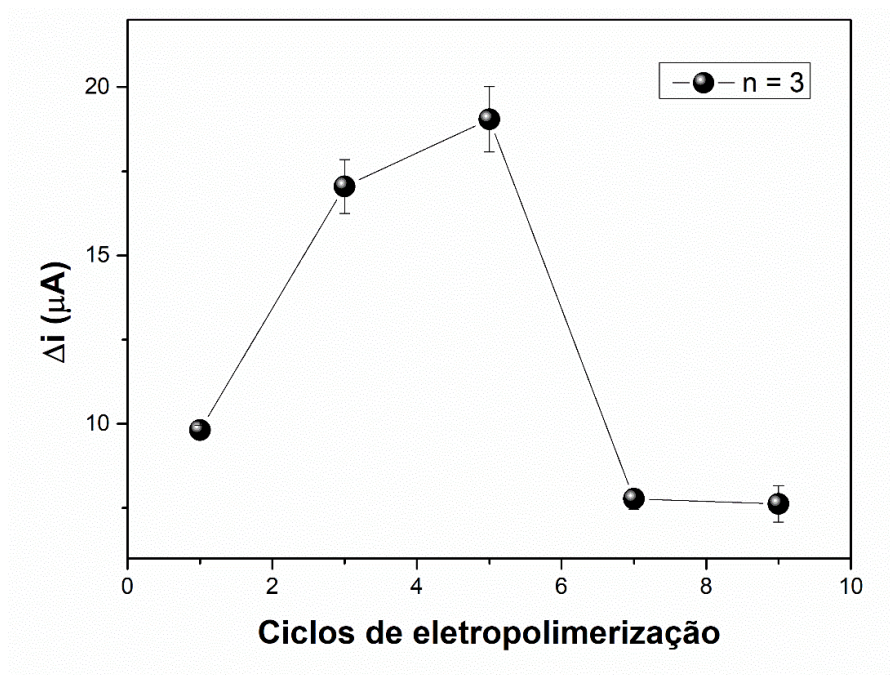
Em concentrações mais baixas, a resposta é consideravelmente mais baixa que o ponto ótimo, fato relacionado à baixa formação de cavidades seletivas e a formação de um filme não muito estável. Ao analisar concentrações mais elevadas, a resposta do sensor também decresce significativamente. Este fato está relacionado ao excesso de monômero na solução de eletropolimerização, tornando a quantidade de limoneno insuficiente para interagir com o polímero e a formação de um filme espesso, então, nota-se uma redução de detectibilidade no dispositivo para detecção dos analitos [156].

Portanto, a concentração ideal de Py para a formação do filme MIP é $3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

4.2.3.2 Efeito da quantidade de ciclos de eletropolimerização

Este parâmetro é fundamental para determinar a espessura do filme polimérico formado na superfície do eletrodo. Desta maneira, a Figura 19 apresenta a resposta do sensor sendo elevada em relação a quantidade de ciclos aplicados até 5 ciclos, indicando fortemente um aumento de detectibilidade e de cavidades formadas após o processo de eletropolimerização. Abaixo disso a variação de corrente obtida é menor devido a formação de um filme com baixa cobertura, resultando a formação de um filme com poucas cavidades formadas.

Figura 19: Estudo da influência da quantidade de ciclos durante a eletropolimerização do MIP, monitorado por DPV em $K_3[Fe(CN)_6]$ $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução de 0,10 mol L⁻¹ KCl.



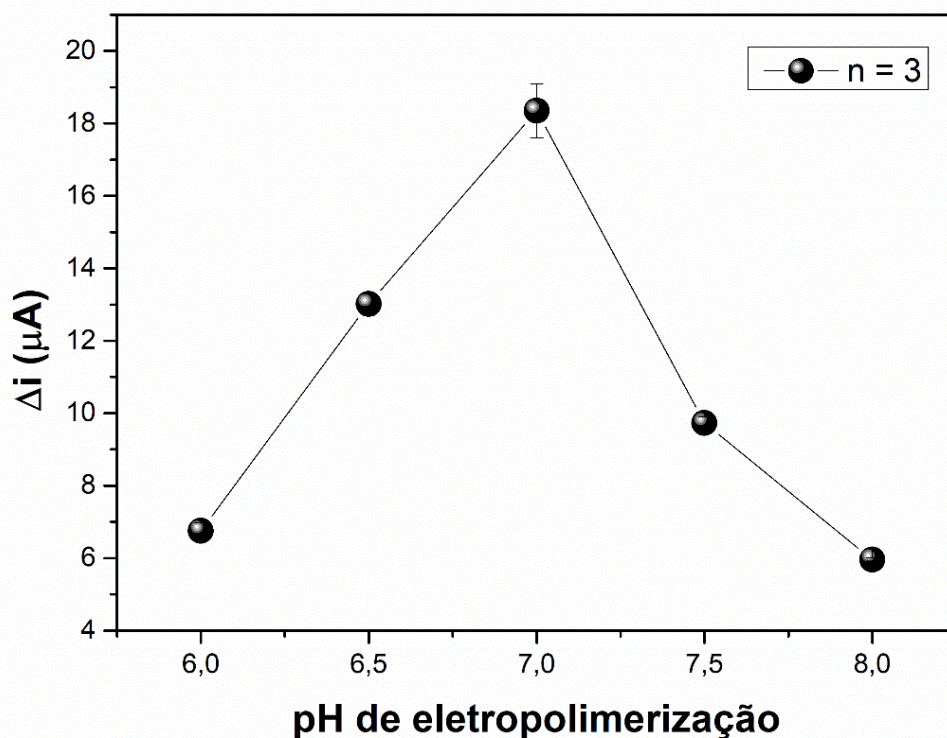
Fonte: elaborado pelo autor.

A resposta do sensor diminui significativamente acima de 5 ciclos devido a formação de um filme muito espesso, dificultando a transferência de massa na interface eletrodo/solução [156]. Assim, 5 ciclos voltamétricos foi considerado como a quantidade ideal para a eletropolimerização do filme de PPy com impressão molecular na superfície do dispositivo.

4.2.3.3 Efeito do pH de eletropolimerização

O pH de eletropolimerização é outro parâmetro essencial na construção do sensor. Uma faixa de pH de 6,0 a 8,0 foi empregada para avaliar o processo de eletropolimerização utilizando solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. Conforme apresentado na Figura 20, é possível observar uma resposta máxima do sensor em pH 7,0. Entretanto, em pH abaixo de 7,0 a variação de corrente obtida é menor e em pH básico ocorre uma queda significativa de sinal. Este fato indica um favorecimento nas interações entre as unidades de PPy e os enantiômeros de D) e (L)-limoneno causado em meio neutro [156]. Logo, o pH 7,0 foi fixado para o preparo da solução para condução do processo de eletropolimerização.

Figura 20: Variação de corrente obtida no estudo do pH durante a eletropolimerização do MIP, monitorado por DPV e sonda eletroquímica de K₃[Fe(CN)₆] 5,0×10⁻³ mol L⁻¹ em solução de 0,10 mol L⁻¹ KCl.

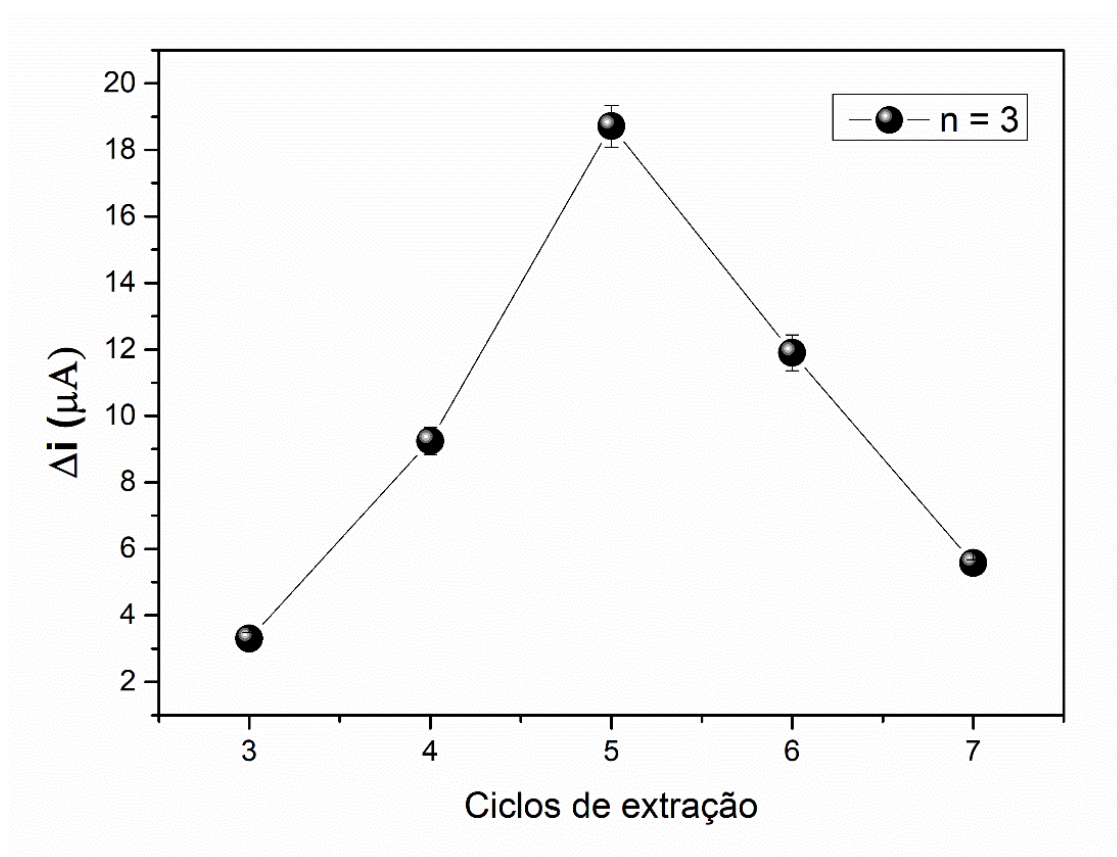


Fonte: elaborado pelo autor.

4.2.3.4 Efeito da quantidade de ciclos de extração

O próximo parâmetro estudado foi a extração da molécula molde no filme formado na superfície eletródica. Para remover o analito da matriz polimérica foi utilizada a extração eletroquímica, realizando uma superoxidação em meio alcalino com base forte, em que o eletrodo de trabalho foi submetido a sucessivos ciclos voltamétricos na faixa de potencial de 0 V a 1,5V em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Conforme a Figura 21, é possível observar que foi estudado entre 3 e 7 ciclos voltamétricos, sendo que o ponto definido como ótimo foi de 5 ciclos. Abaixo da quantidade de ciclos ideal observa-se que a variação de corrente é menor, indicando que as moléculas não foram extraídas com eficiência. Já acima de 5 ciclos, o filme é oxidado em excesso, provocando uma diminuição da detectibilidade do sensor [156]. Nesta etapa foi obtido o GCE/rGO/AuNPs/MIP.

Figura 21: Variação de corrente obtida no estudo dos ciclos de extração, monitorado por DPV e sonda eletroquímica de K₃[Fe(CN)₆] 5,0×10⁻³ mol L⁻¹ em solução de 0,10 mol L⁻¹ KCl.

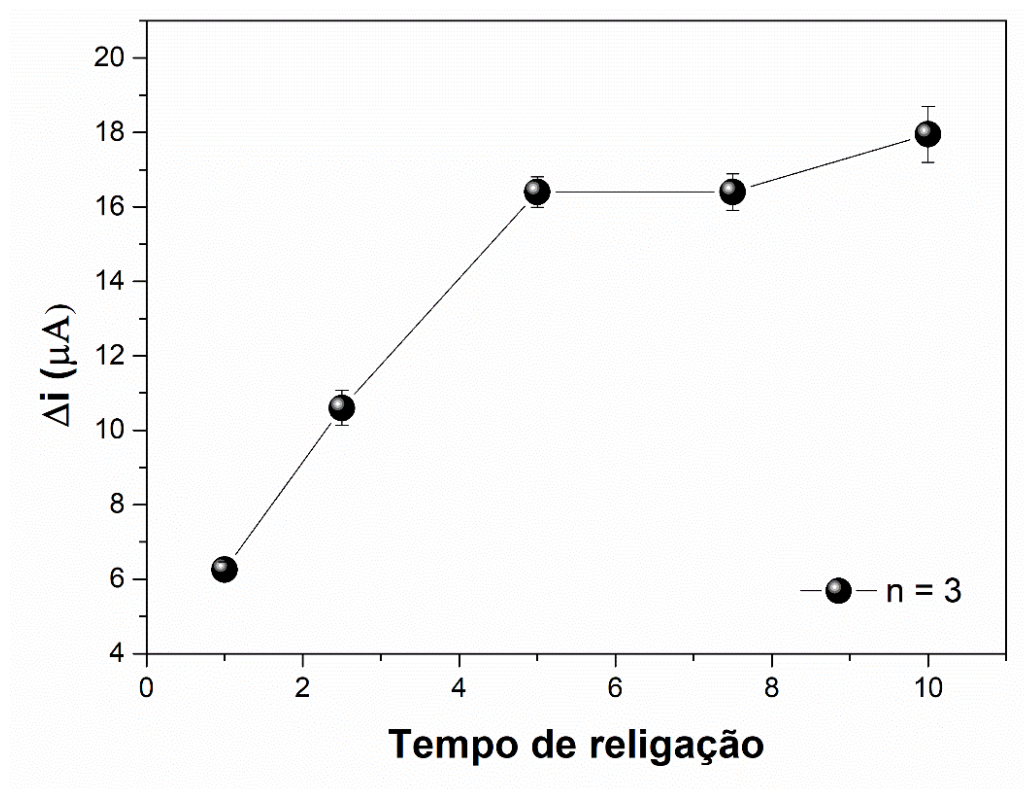


Fonte: elaborado pelo autor.

4.2.3.5 Efeito do tempo de religação

O último parâmetro otimizado foi o tempo de religação do analito na superfície polimérica, que também influencia no desempenho analítico. Após a formação das cavidades dos analitos no processo de extração, o eletrodo é imerso em soluções contendo (D) e (L)-limoneno em tampão fosfato pH 7,0, sob agitação, para que os analitos se religuem nas suas cavidades específicas. A faixa estudada para esse parâmetro variou entre 1 e 10 minutos para cada analito, sendo que com 5 minutos foi obtida a melhor resposta. Após esse tempo foi observada variação de corrente praticamente estável, conforme Figura 22, indicando que as cavidades disponíveis formadas já foram preenchidas com o analito de interesse e foi atingido o equilíbrio de adsorção. Abaixo de 5 minutos a resposta decaiu consideravelmente, mostrando que o tempo de interação não foi o suficiente para preencher as cavidades disponíveis na superfície do eletrodo [156]. Sendo assim, 5 minutos foi escolhido como o tempo ideal para religação de cada analito.

Figura 22: Variação de corrente obtida no estudo do tempo de religação, monitorado por DPV e sonda eletroquímica de $K_3[Fe(CN)_6]$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl.



Fonte: elaborado pelo autor.

A Tabela 3 mostra um resumo dos parâmetros analisados, a faixa de intervalo estudada e o valor definido como ótimo.

Tabela 3: Parâmetros experimentais otimizados que influenciam o desempenho analítico do GCE/rGO/AuNPs/MIP.

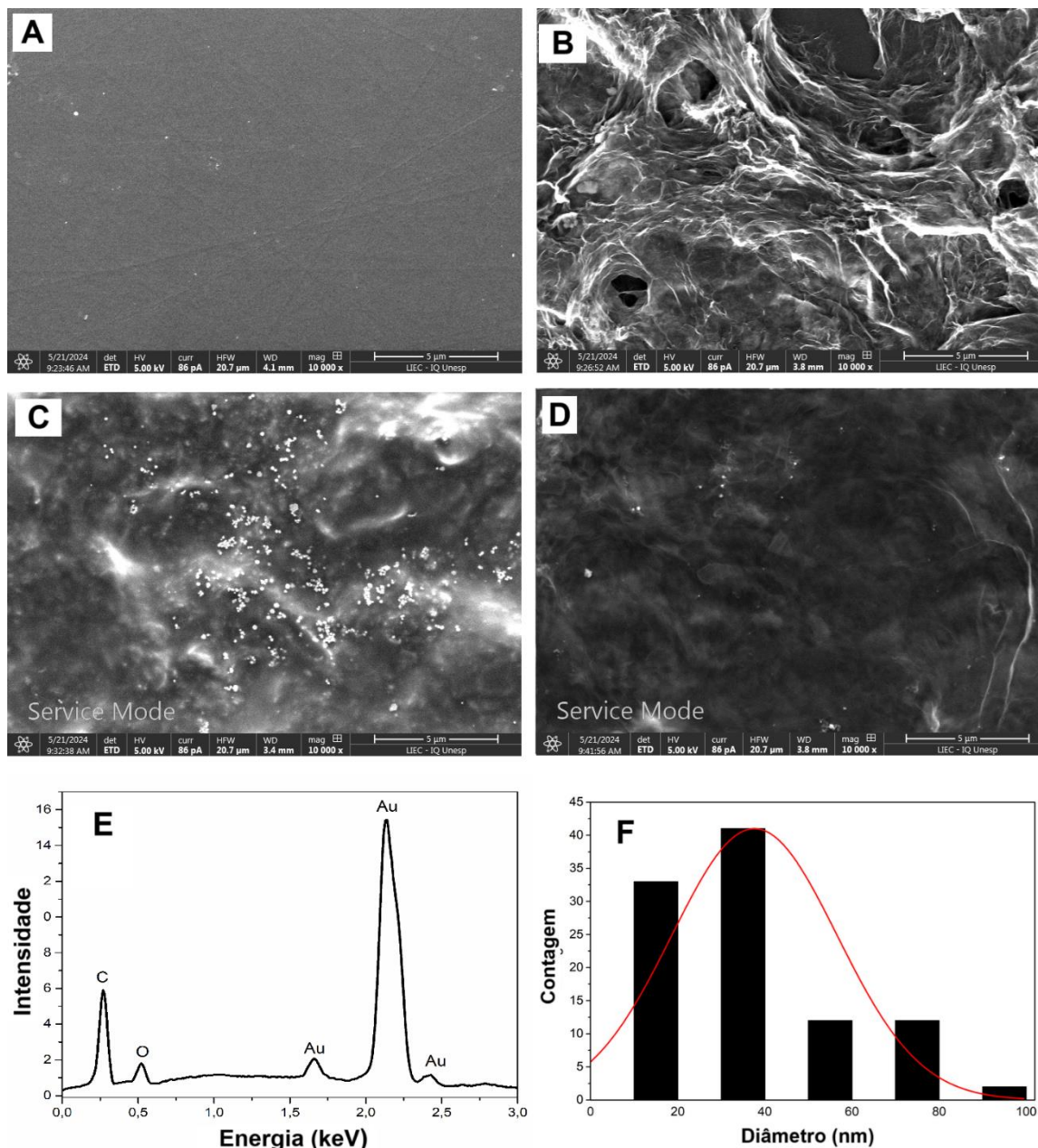
Parâmetros	Intervalo	Condições otimizadas
Concentração de Py (mol L ⁻¹)	5,0×10 ⁻³ -9,0×10 ⁻²	3,0×10 ⁻²
Ciclos de eletropolimerização	1-9	5
pH de eletropolimerização	6,0-8,0	7,0
Ciclos de extração	3-7	5
Tempo de religação	1-10 minutos	5 minutos

Fonte: elaborado pelo autor.

4.2.4 Caracterização do eletrodo

As modificações na superfície do eletrodo foram verificadas por SEM e EDS. A Figura 23A mostra a superfície do GCE limpa, sem nenhuma modificação. A Figura 23B apresenta o eletrodo modificado com rGO, em que é possível observar nanofolhas de rGO dispersas homoganeamente pela superfície do eletrodo. Na Figura 23C é demonstrado o eletrodo após a modificação com as AuNPs, em que é possível ver nanoesferas de ouro dispostas sobre as folhas do rGO. A Figura 23D representa o eletrodo após a etapa de eletropolimerização, em que é possível observar a formação de um filme homogêneo sobre a superfície, sendo que se pode afirmar que foi formado um filme fino sobre a superfície pois é possível ver nanopartículas dispersas sob o filme. A análise de EDS (Figura 23E) confirma a presença de nanopartículas de ouro, apresentando três picos característicos em aproximadamente 1,65, 2,15 e 2,40 keV, com um diâmetro médio de 36 nm (n=100), conforme mostra o histograma da Figura 23F.

Figura 23: Imagens de SEM com magnitude de 10.000x para A) GCE, B) GCE/rGO, C) GCE/rGO/AuNPs e D) GCE/rGO/AuNPs/MIP, E) espectro de EDS e F) histograma da distribuição do tamanho das nanopartículas (n = 100).



Fonte: elaborado pelo autor.

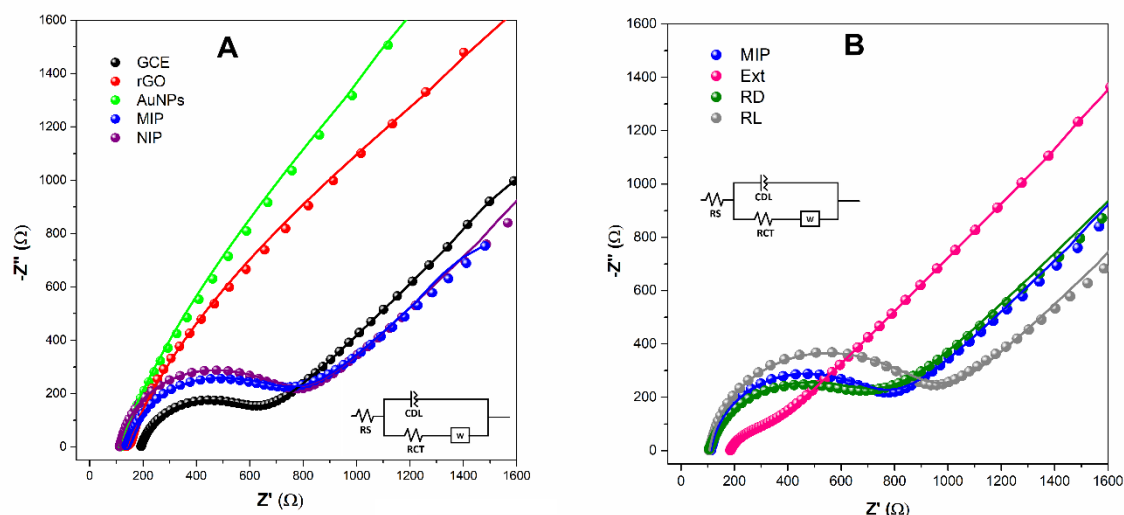
O sensor também foi caracterizado por EIS, que fornece informações da superfície do eletrodo/solução, que foi estudada usando sonda eletroquímica de $K_3[Fe(CN)_6]$ com concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e é representado por diagramas de Nyquist. Nesses diagramas, quando a solução está em altas frequências ocorre a formação de semicírculo, em que seu tamanho está relacionado diretamente com a resistência de transferência de

carga (RCT). Já em baixas frequências, é possível observar uma região mais linear. Conforme apresentado na Figura 24A é feita a caracterização até a formação do MIP, enquanto a Figura 24B é demonstrado as etapas a partir da formação do MIP. Além disso, na inserção da figura está representado o circuito equivalente de Randles de acordo com os dados experimentais obtidos, em que está presente a resistência da solução (R_S), a RCT, o elemento de fase constante (CPE, do inglês *constant phase element*) e o elemento de difusão de impedância de Warburg (W), sendo que os dados são discutidos em termos de RCT.

Analisando os diagramas da Figura 24A, é possível observar um semicírculo bem definido para o GCE, que apresentou uma RCT de 425 Ω . Já para o GCE/rGO nota-se que houve a formação de um semicírculo extremamente pequeno, com RCT de 12,7 Ω e no GCE/rGO/AuNPs um semicírculo ainda menor, com valor de RCT de 3,2 Ω . Essa queda de resistência está atrelada ao fato de que há um aumento da transferência eletrônica ao modificar o eletrodo com esses nanomateriais, então a superfície eletródica não apresenta valores de resistência significativos, estando em concordância com as caracterizações por CV (Figura 15 e Figura 17). Posteriormente, nos eletrodos GCE/rGO/AuNPs/MIP e GCE/rGO/AuNPs/NIP observa-se novamente a formação de semicírculos bem definidos, com RCT de 605 Ω e 609 Ω , respectivamente. O aumento de valor é devido a resistência da superfície após modificação da superfície com o filme de PPy, sendo que não há diferença aparente e em termos de resistência entre o MIP e o NIP.

Os diagramas da Figura 24B foram feitos a partir da formação do filme polimérico. Para a etapa de extração observa-se um pequeno semicírculo formado, que ocorre devido ao aumento de transferência de carga na superfície do eletrodo pelas cavidades formadas fazendo com que a sonda atinja a superfície do eletrodo, ou seja, a resistência é baixa (169 Ω). Já para as etapas de religação do (D) e (L)-limoneno é observado a formação de semicírculos bem definidos, pois as cavidades foram preenchidas e a sonda não atinge a superfície, então a resistência de carga aumenta consideravelmente, 592 Ω e 725 Ω para a religação com o (D) e (L)-limoneno, respectivamente. Os dados obtidos pela EIS estão concordantes às respostas obtidas por CV.

Figura 24: Diagrama de Nyquist para A) GCE, GCE/rGO, GCE/rGO/AuNPs, GCE/rGO/AuNPs/MIP e GCE/rGO/AuNPs/NIP e B) GCE/rGO/AuNPs/MIP antes da extração, após a extração e após as religações do (D) e (L)-limoneno. As medidas foram realizadas em solução de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, amplitude de $0,01 \text{ V}_{\text{RMS}}$ e potencial de $0,22 \text{ V}$.



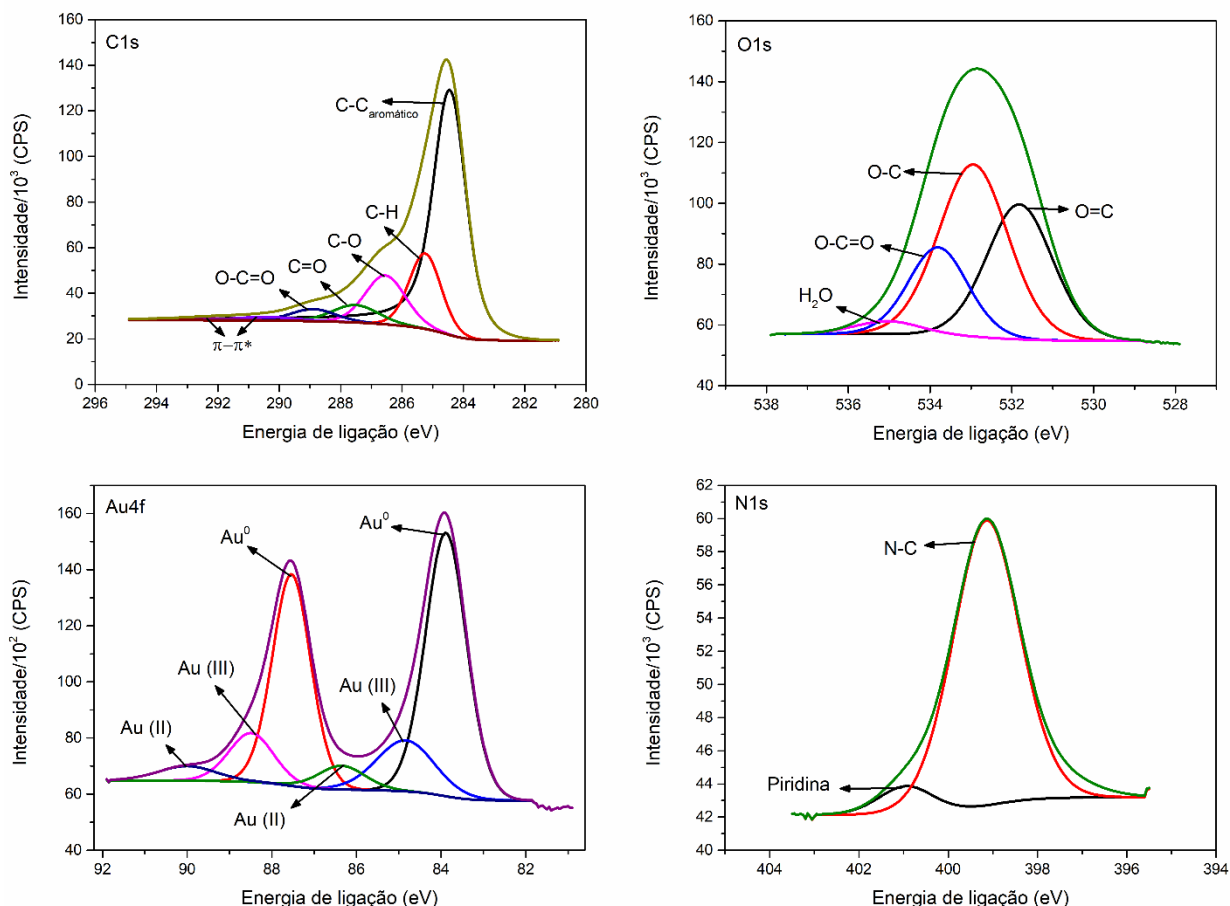
Fonte: elaborado pelo autor.

O XPS também foi empregado para avaliar as modificações realizadas na construção do eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP, pois é uma técnica versátil que verifica a região superficial ($<5 \text{ nm}$) e identifica os elementos presentes nas amostras, determina a sua composição e analisa a estrutura das ligações químicas e estados de oxidação [157]. Na Figura 25 é possível observar os espectros de C1s, O1s, Au4f e N1s presentes no GCE/rGO/AuNPs/MIP deconvoluídos. O espectro de C1s é deconvoluído em 6 componentes presentes na amostra para o átomo de carbono no rGO, dentre estes a ligação C–C sp^2 aromático em maior predominância em torno de $284,4 \text{ eV}$, que corresponde a aproximadamente 62% da amostra, e em intensidades menores estão presentes a ligação C–H ($285,2 \text{ eV}$), C–O ($286,5 \text{ eV}$), carbonila (C=O), em $287,9 \text{ eV}$ e carboxila (O–C=O) em $288,9 \text{ eV}$. É observado também dois picos deconvoluídos referente as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ em aproximadamente 291 eV e $292,5 \text{ eV}$, que acaba gerando uma assimetria no pico C–C aromático [158].

No espectro de oxigênio O1s o pico é deconvoluído em quatro diferentes espécies presentes para o rGO, em maior intensidade tem presente a ligação O–C, em $532,5 \text{ eV}$. Há também a presença de O=C em $531,5 \text{ eV}$ e O–C=O, em

533,5 eV. É possível observar um pico de pequena intensidade em aproximadamente 535,3 eV que é correspondente a água molecular, geralmente encontrada em nanoestruturas de carbono [157,158].

Figura 25: Espectros deconvoluídos de XPS para C1s, O1s, Au4f e N1s.



Fonte: elaborado pelo autor.

Já para o espectro de ouro Au4f nota-se a presença de três diferentes componentes deconvoluídas que confirma a modificação da superfície do eletrodo com ouro, a espécie Au₂O₃, em aproximadamente 85 eV e 88,5 eV, a espécie AuSO₄, com picos em 86,3 eV e 90 eV, e a espécie de ouro metálico, em 83,9 e 87 eV. No último espectro, referente ao N1s, o pico é deconvoluido em dois componentes, a piridina, em 398,1 eV, e N-C, em 401 eV, pico tipicamente atribuído ao pirrol nessa energia de ligação [158].

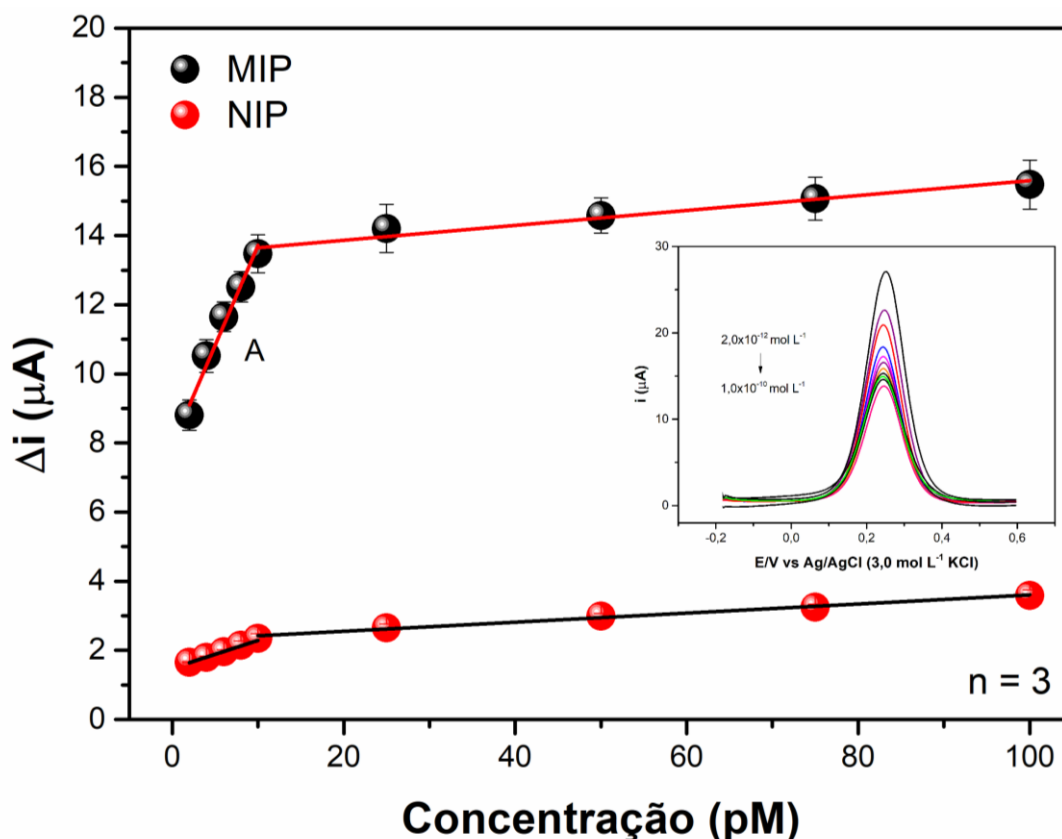
4.2.5 Desempenho analítico do eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP

Com o intuito de avaliar o desempenho do sensor foram construídas as curvas analíticas para o (D) e (L)-limoneno. A capacidade do sensor de

reconhecer as moléculas de (D)-limoneno foi inicialmente avaliada por DPV por meio de variação de resposta do sensor utilizando a sonda eletroquímica após o processo de religação, usando inicialmente uma solução mais concentrada de (L)-limoneno de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0 com o intuito de saturar as cavidades enantiosseletiva desse isômero, com posterior religação em soluções de diferentes concentrações do enantiômero (D) em tampão fosfato pH 7,0, durante 5 minutos. Neste sentido, a inserção da Figura 26 indica que a corrente de pico da sonda eletroquímica decresce inversamente proporcional à concentração de (D)-limoneno, sendo que este fato é atribuído a ocupação das cavidades formadas ao longo de toda a extensão do filme polimérico. Adicionalmente, a Figura 26 também apresenta a curva analítica construída para esse enantiômero em duas faixas de trabalho: $2,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, sendo que a primeira faixa, por ser mais sensível, foi usada para construção das figuras de mérito. A equação de regressão linear obtida foi $\Delta i \text{ (A)} = 7,94 + 5,77 \times 10^5 C \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$, com um coeficiente de relação de 0,990. O LD encontrado foi de $1,8 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$, LQ de $5,5 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ e SA $5,7 \times 10^5 \text{ A L mol}^{-1}$ ($n=3$).

A existência de duas faixas lineares é explicada pela formação de cavidades possuindo diferentes afinidades com a molécula de interesse, sendo que em concentrações menores do analito as moléculas ocuparão preferencialmente as cavidades superficiais e com maior afinidade, e, com isso, as regiões mais internas da superfície do eletrodo, que possui as cavidades com menor afinidade, serão ocupadas por último. Em razão disso, a inclinação da segunda faixa diminui devido à transferência massa dificultada que o analito enfrenta para alcançar essas cavidades internas [111,156]. Além disso, também foi estudado o NIP da curva analítica sob as mesmas condições experimentais, mas na ausência dos analitos de interesse na formação do filme para avaliar a formação das cavidades impressas, sendo que foi observado que não houve uma variação considerável de corrente, indicando que não há a formação de sítios.

Figura 26: Curva analítica para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP após 5 minutos de religação em diferentes concentrações de (D)-limoneno. Inserção: DPV para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP após 5 minutos de religação em diferentes concentrações. As medidas foram realizadas em solução de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

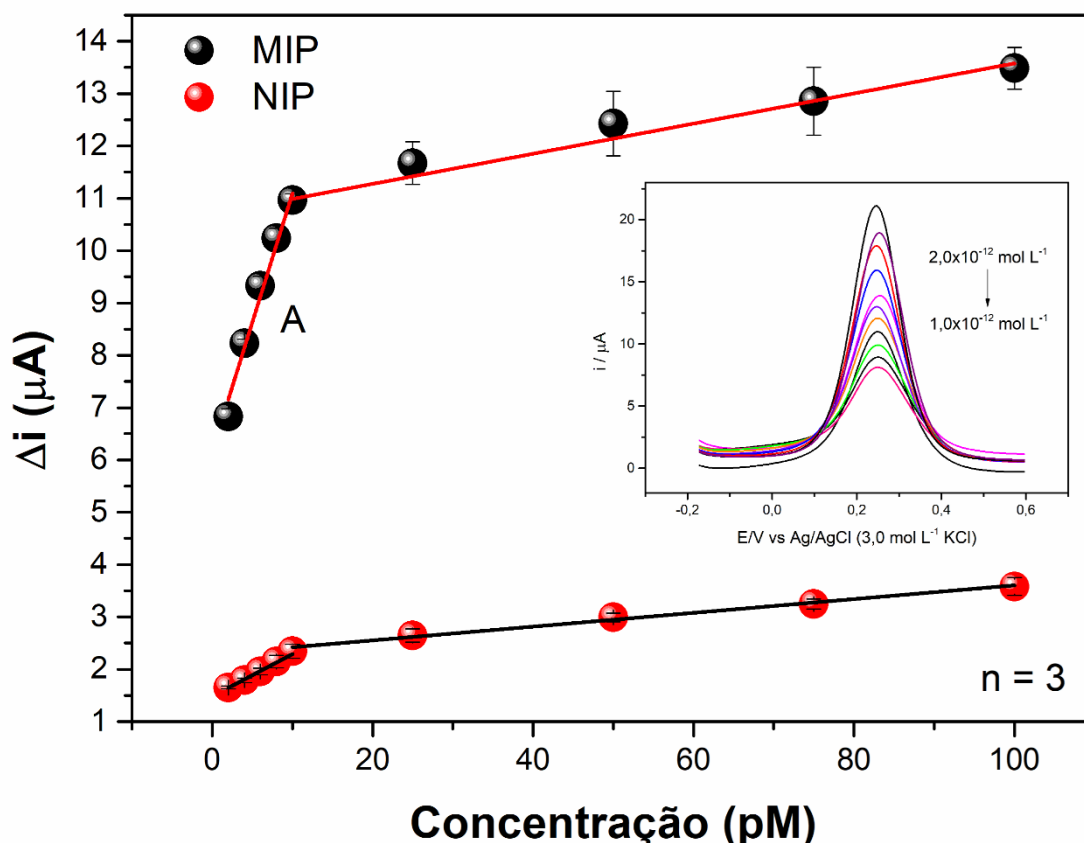


Fonte: elaborado pelo autor.

Após, foi construída a curva analítica para o (L)-limoneno, sendo feita a saturação do enantiômero (D) em concentração $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0 por 5 minutos e a posterior religação do enantiômero (L) em diferentes concentrações por 5 minutos cada, também em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. O perfil observado (Figura 27) foi o mesmo para o (D)-limoneno e a faixa de trabalho estudado também foi o mesmo. A equação de regressão obtida foi $\Delta i \text{ (A)} = 6,17 + 6,17 \times 10^5 C \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$, com LD de $1,4 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$, LQ de $4,3 \times 10^{-12}$ e SA de $6,17 \times 10^5$. Essa é a primeira abordagem analítica reportada para a determinação enantiosseletiva de (D) e (L)-limoneno. Há alguns trabalhos na literatura para determinação de um único

enantiômero, o (D)-limoneno [58–61,64,65,68], com LD na escala mili e micromolar.

Figura 27: Curva analítica para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP após 5 minutos de religação em diferentes concentrações de (L)-limoneno. Inserção: DPV para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP após 5 minutos de religação em diferentes concentrações. As medidas foram realizadas em solução de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .



Fonte: elaborado pelo autor.

4.2.6 Estudo de seletividade

Sensores baseados em MIP possui como principal característica a seletividade. Entretanto, pode ser possível que moléculas com os mesmos grupos funcionais ou com tamanho similar ao analito de interesse possa interferir no processo de reconhecimento molecular, sendo necessário realizar análises para verificar a eficiência do sensor construído [143,156]. A avaliação da seletividade do sensor é feita durante a etapa de religação, em que a solução é preparada com diferentes moléculas que possam atuar como possíveis interferentes. No caso desse trabalho, o estudo foi realizado com outros terpenos

e moléculas presentes em óleo essencial de laranja (que tem como principal composto o (D)-limoneno), como o mirceno, valenceno e sabineno, e o óleo essencial de pinho (que tem como principal composto o (L)-limoneno), avaliando moléculas como borneol, terpineno e canfeno. Todas as moléculas usadas na etapa de religação estavam na concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0.

Os resultados obtidos para possíveis interferentes do (D)-limoneno estão representados na Figura 28, sendo avaliada a variação de corrente obtida em DPV de cada molécula em comparação com a variação de corrente obtida para o (D)-limoneno (n=3). Observa-se que a variação de corrente para o (D)-limoneno é o que possui a maior intensidade, com um valor de variação de corrente de aproximadamente 18,5 μ A. Para as outras moléculas, o valor da variação de corrente obtido é muito baixo. Pode-se afirmar que as cavidades na matriz polimérica foram formadas com sucesso e que são seletivas para a determinação do (D)-limoneno, pois como os sítios formados são seletivos em tamanho e conformação do analito de interesse, esses interferentes presentes ficam impedidos de penetrar efetivamente nas cavidades impressas na superfície do eletrodo. Isso se dá devido à diferença de afinidade entre as cavidades e os possíveis interferentes, o que dificulta a interação com a matriz polimérica. Foi feito também o estudo do NIP, como não são formadas cavidades a variação de corrente obtida foi atribuída à adsorção dos compostos na superfície do eletrodo.

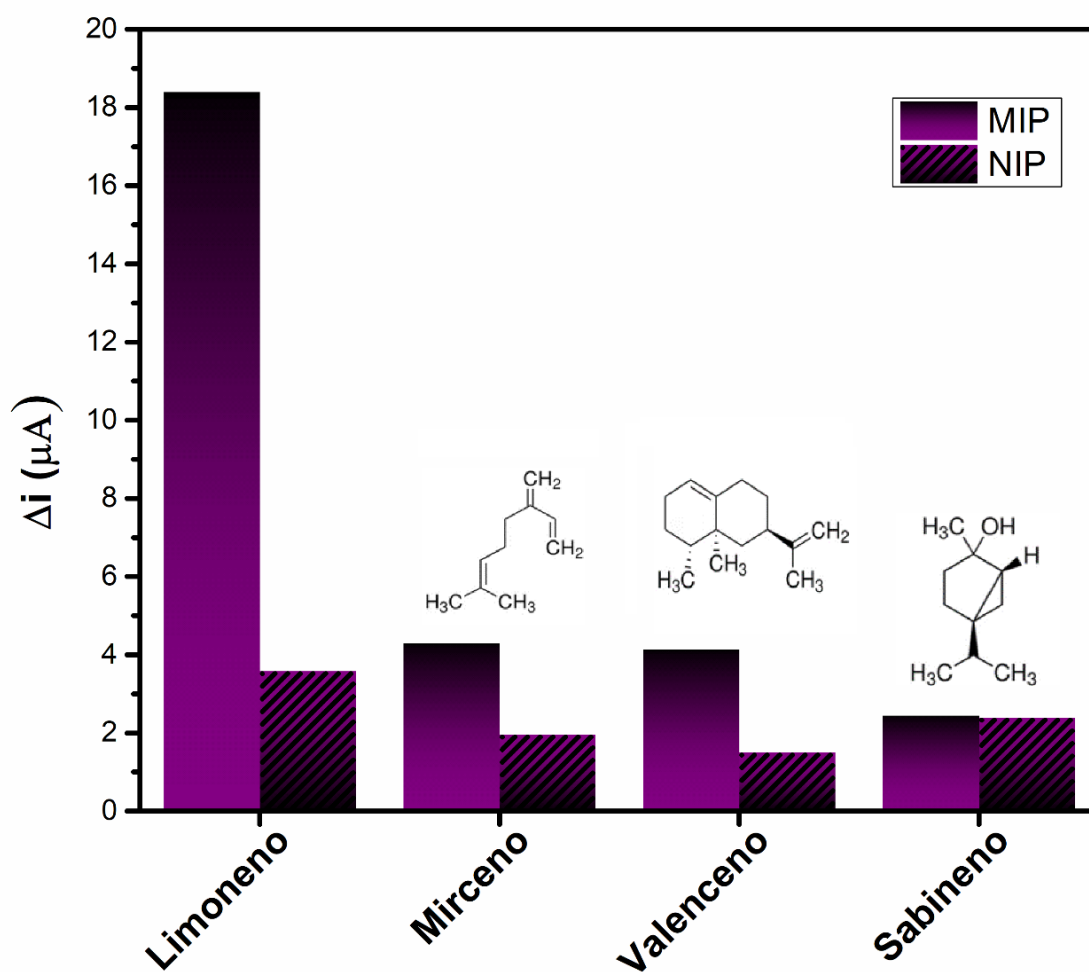
Foram calculados os valores do fator de impressão (α) (Equação 3) e o fator de seletividade (β) (Equação 4). Quanto ao valor de α , relacionado com a existência de cavidades formadas para a molécula de interesse, foi obtida uma maior resposta para o (D)-limoneno, indicando um melhor reconhecimento dessa molécula. Para as moléculas de possíveis interferentes, o esperado é que o valor seja o menor possível e mais próximo de 1, apontando que na etapa de religação os valores encontrados estão próximos dos valores para o NIP, que indica que essas moléculas não se religaram nas cavidades formadas. Quanto ao fator de seletividade, que indica a formação de cavidades seletivas para o analito de interesse, é possível identificar que há uma maior afinidade com a molécula de

(D)-limoneno, apontando uma maior seletividade para esse analito já que os valores para os possíveis interferentes são maiores que 1, conforme Tabela 4.

$$\alpha = \frac{\Delta MIP}{\Delta NIP} \text{ (Equação 3)}$$

$$\beta = \frac{\alpha (\text{limoneno})}{\alpha (\text{interferente})} \text{ (Equação 4)}$$

Figura 28: Variação de corrente monitorada usando sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . obtida para os eletrodos GCE/rGO/AuNPs/MIP e GCE/rGO/AuNPs/NIP após 5 minutos de religação em solução contendo $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de cada molécula em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.



Fonte: elaborado pelo autor.

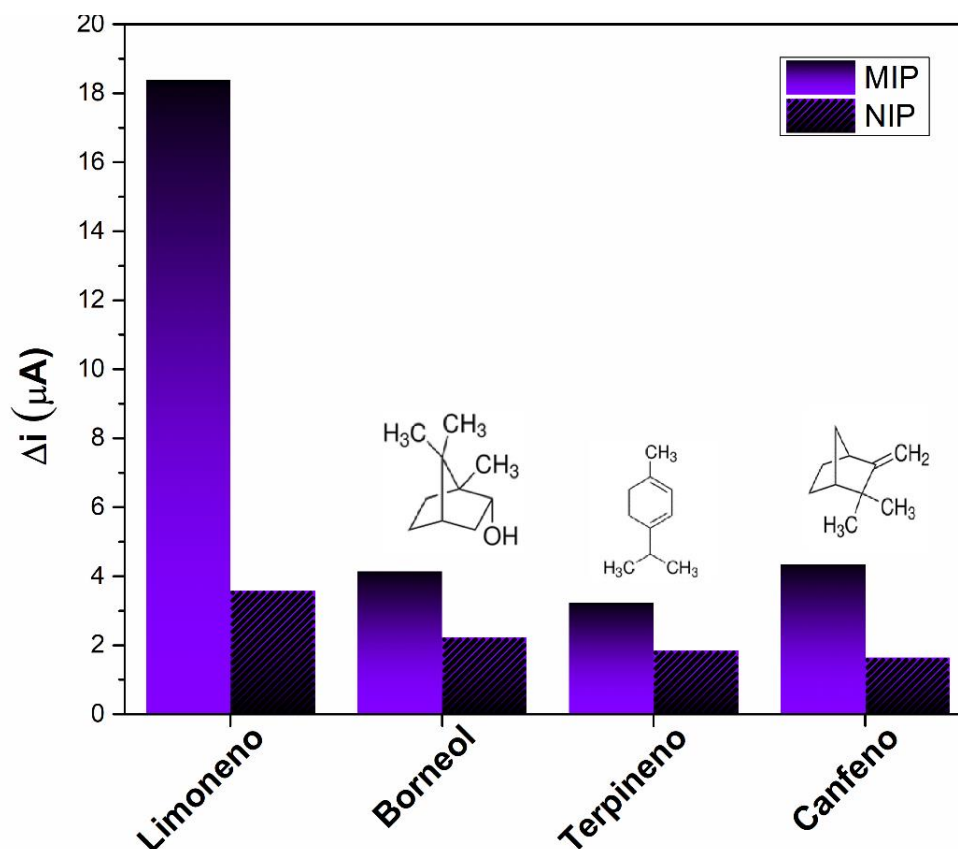
Tabela 4: Parâmetros de seletividade avaliados para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP em relação à detecção de (D)-limoneno.

Molécula	MIP (μA)	NIP (μA)	α	β
Limoneno	18,4	3,58	5,14	1,00
Mirceno	4,29	1,96	2,19	2,35
Valenceno	4,12	1,50	2,75	1,87
Sabineno	2,43	2,29	1,02	5,04

Fonte: elaborado pelo autor.

Foi feito o estudo também para possíveis interferente para o (L)-limoneno, com terpenos, moléculas com estrutura similar e presentes em óleo essencial de pinho (Figura 29). Foi observado que não houve variação de corrente significativa para as moléculas estudadas como possíveis interferentes, indicando que as cavidades são seletivas para o (L)-limoneno.

Figura 29: Variação de corrente monitorada usando sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , obtida para os eletrodos GCE/rGO/AuNPs/MIP e GCE/rGO/AuNPs/NIP após 5 minutos de religação em solução contendo $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de cada molécula em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0



Fonte: elaborado pelo autor.

Foi calculado os valores de α e β para cada molécula, conforme Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de seletividade avaliados para o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP em relação à detecção de (L)-limoneno.

Molécula	MIP (μA)	NIP (μA)	α	β
Limoneno	18,4	3,58	5,14	1,00
Borneol	4,14	2,23	1,86	2,76
Terpineno	3,22	1,84	1,75	2,94
Canfeno	4,33	1,64	2,64	1,95

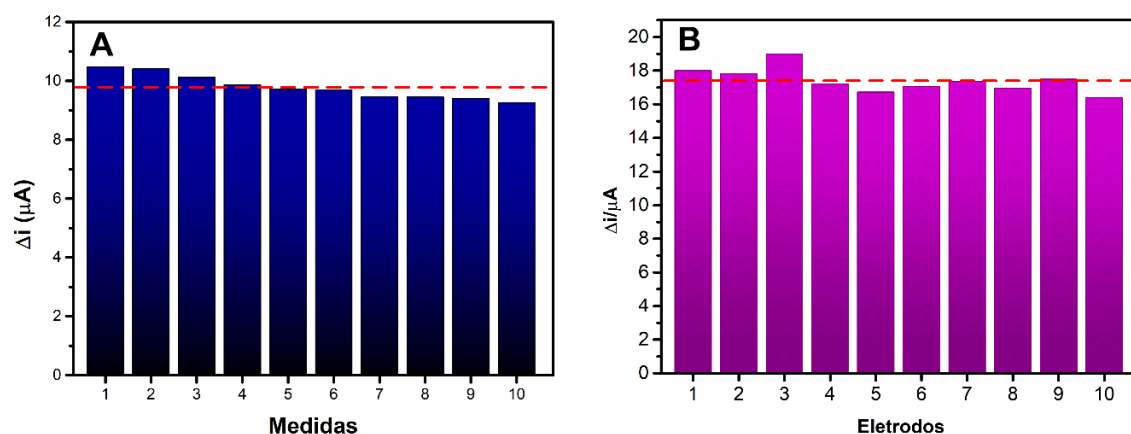
Fonte: elaborado pelo autor.

Analizando o fator de impressão, a maior resposta foi encontrada para o (L)-limoneno, o que indica um maior reconhecimento dessa molécula. Para o fator de seletividade, é possível identificar que há uma maior afinidade com a molécula de (L)-limoneno também, mostrando uma maior seletividade para o analito. Esses resultados confirmam que os sítios formados na superfície do eletrodo são seletivos para o reconhecimento das moléculas de limoneno.

4.2.7 Estudo de repetibilidade e estabilidade

Análises intradia e interdia foram usadas para monitorar a resposta do sensor. Para a realização das análises intradia, um único sensor foi construído para a realização de 10 detecções sucessivas de (D) e (L)-limoneno. As medidas foram realizadas por DPV e foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) dos valores obtidos, conforme Figura 30A. Ao final de cada medida, o sensor foi submetido ao processo de superoxidação para remoção das moléculas presentes nas cavidades impressas visando a regeneração desses sítios, para que o processo de detecção fosse realizado novamente. Assim, o valor médio das respostas obtidas nessas medidas foi 9,8 μA , com DPR de 4,8% ($n = 10$), sendo calculada a variação de corrente entre as etapas de religação dos dois enantiômeros. No monitoramento interdia, 10 diferentes sensores foram construídos nas mesmas condições em diferentes dias, sendo calculada a variação de corrente entre a etapa de extração e a religação dos dois enantiômeros, conforme Figura 30B. O valor médio obtido das respostas neste estudo foi 17,4 μA , com DPR de 4,3% ($n = 10$).

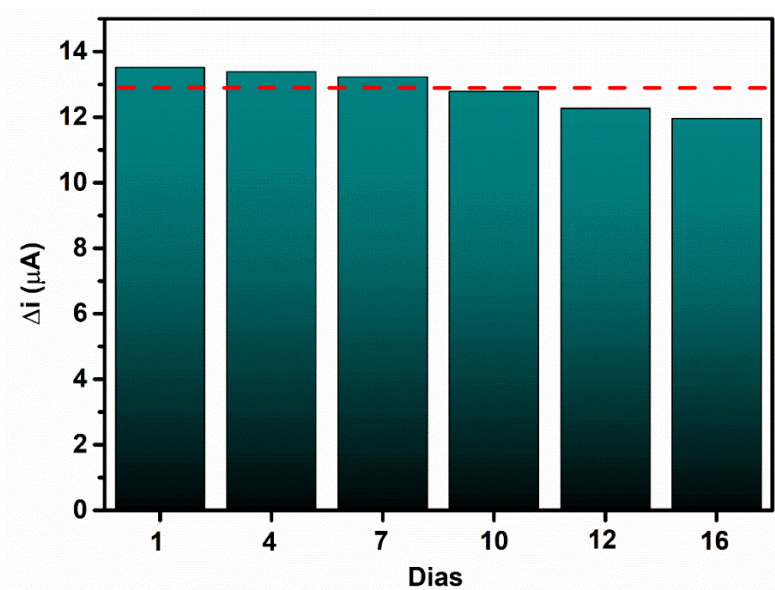
Figura 30: Estudo de repetibilidade com 10 medidas A) intradia e B) interdia.



Fonte: elaborado pelo autor.

A avaliação da estabilidade do eletrodo GCE/rGO/AuNPs foi realizada através de um único sensor que, após preparado, foi condicionado após a etapa de religação por 16 dias em contato com o ar em temperatura de 25 °C. Então, foram feitas medidas em dias alternados em DPV, usando uma sonda redox para a avaliação dos processos de extração e religação da molécula molde. A partir deste estudo, o sensor apresentou uma corrente de 13 μA com DPR de 4,9% ($n = 7$). Ao término de 16 dias foi preservado cerca de 89% da magnitude de corrente obtida inicialmente (Figura 31). Logo, os resultados obtidos nos estudos de repetibilidade e estabilidade mostram que o sensor GCE/rGO/AuNPs/MIP pode ser aplicado para determinação das moléculas enantioméricas de limoneno com uma grande repetibilidade e estabilidade.

Figura 31: Estudo de estabilidade durante 16 dias.



Fonte: elaborado pelo autor.

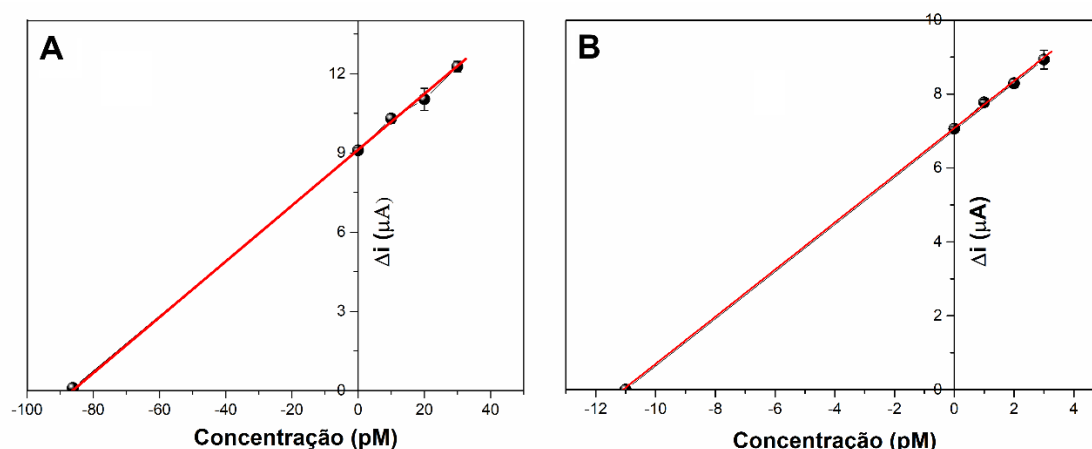
4.2.8 Determinação do (D) e (L)-limoneno em óleo essencial de laranja e pinho

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade do sensor proposto, este foi aplicado em óleo essencial de laranja, que possui como principal composto o (D)-limoneno, e óleo essencial de pinho, que possui como principal composto o enantiômero (L). Não houve necessidade de pré-tratamento de amostra.

O óleo essencial de laranja foi diluído em acetonitrila e posteriormente em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 para ser usado na etapa de religação, usando o método de adição de padrão para determinação do (D) e (L) limoneno (Figura 32) nessa amostra, que consiste em adicionar concentrações conhecidas do analito de interesse à amostra. Foi construída uma curva analítica para obtenção do sinal analítico e extrapolação da reta até o eixo das abcissas para determinação do valor em amostra.

Para a determinação do (D)-limoneno (Figura 32A), o sensor foi construído em todas as condições otimizadas e na etapa de religação foi feita a saturação do (L)-limoneno em concentração de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 por 5 minutos, e a posterior religação com a amostra (concentração desconhecida). As concentrações conhecidas adicionadas de padrão de (D)-limoneno foram 10, 20 e 30 pmol L^{-1} . A concentração de (D)-limoneno encontrada em óleo essencial de laranja, já considerado o fator de diluição, foi de $8,7 \times 10^{-2} \pm 6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($11,7 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$) ($n=3$). Para a determinação do (L)-limoneno (Figura 32B), foi feita a superoxidação da superfície do eletrodo para regenerar as cavidades, com a posterior saturação dos sítios de (D)-limoneno com solução em concentração de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 por 5 minutos, com a religação posterior de (L)-limoneno. As concentrações conhecidas adicionadas de padrão de (L)-limoneno foram 1,0, 2,0 e 3,0 pmol L^{-1} . A concentração de (L)-limoneno encontrada em óleo essencial de laranja, já considerado o fator de diluição, foi de $1,1 \times 10^{-3} \pm 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,15 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$) ($n=3$).

Figura 32: Curvas de adição de padrão para determinação da A) (D)-limoneno e B) (L)-limoneno em óleo essencial de laranja.

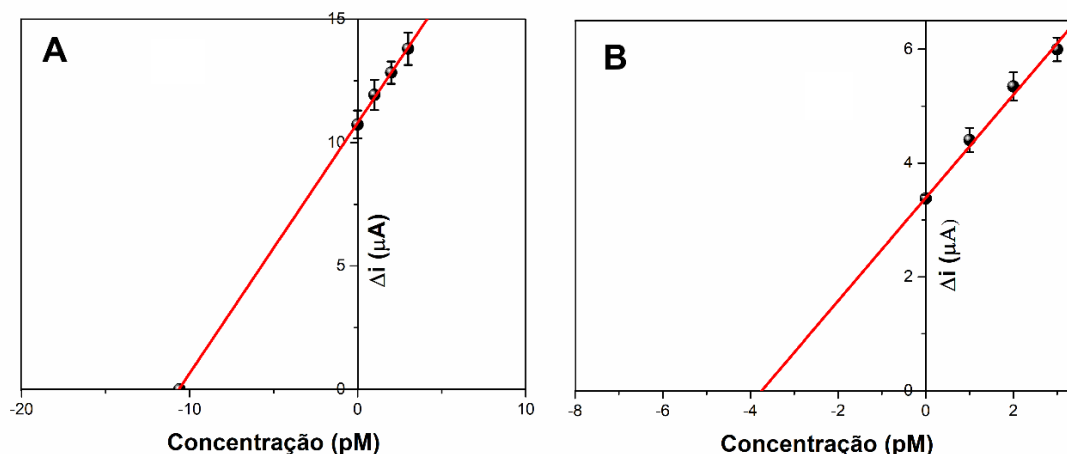


Fonte: elaborado pelo autor.

Para a determinação de limoneno em óleo essencial de pinho foi adotada a mesma abordagem usada para determinação em óleo essencial de laranja. É possível observar as curvas analíticas do (D) e (L)-limoneno na Figura 33.

O padrão de (D)-limoneno (Figura 33A) adicionado à amostra foi nas concentrações de 1,0, 2,0 e 3,0 $\mu mol L^{-1}$. A concentração de (D)-limoneno encontrada em óleo essencial de pinho, já considerado o fator de diluição, foi de $1,0 \times 10^{-4} \pm 1,5 \times 10^{-5} mol L^{-1}$ ($0,014 \pm 1,7 \times 10^{-3} g L^{-1}$) ($n=3$). Na determinação do (L)-limoneno (Figura 33B), as concentrações conhecidas adicionadas de padrão de (L)-limoneno também foram 1,0, 2,0 e 3,0 $\mu mol L^{-1}$. A concentração de (L)-limoneno encontrada em óleo essencial de pinho, já considerado o fator de diluição, foi de $3,7 \times 10^{-3} \pm 3,3 \times 10^{-4} mol L^{-1}$ ($0,51 \pm 0,05 g L^{-1}$) ($n=3$).

Figura 33: Curvas de adição de padrão para determinação do A) (D)-limoneno e B) (L)-limoneno em óleo essencial de pinho.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os valores obtidos de (D) e (L)-limoneno para os óleos essenciais de laranja e de pinho condizem com o reportado na literatura que em frutas cítricas a concentração de (D)-limoneno é muito maior que a concentração de (L)-limoneno, muitas vezes sendo até desprezada. Já para o óleo de pinho, essa relação está mais próxima, porém a concentração majoritária presente é de (L)-limoneno para as árvores de pinho.

Como parâmetro de avaliação foi feito o ensaio de recuperação, com a finalidade de avaliar se a concentração encontrada corresponde à adicionada, representado na Tabela 6. Para esse estudo, foi feita a recuperação de (D)-limoneno em óleo essencial de laranja e (L)-limoneno em óleo essencial de pinho, pois são os enantiômeros majoritários em sua respectiva amostra. Analisando os valores de recuperação, que variam de 90,5% a 112,6%, e os desvios todos abaixo de 5%, pode se afirmar que o eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP possui uma grande precisão para a determinação do enantiômero de limoneno.

Tabela 6: Determinação de (D) e (L)-limoneno em óleo essencial de laranja e pinho, respectivamente (n=3).

Amostra	Quant. adicionada (10⁻¹¹ mol L⁻¹)	Quant. detectada (10⁻¹¹ mol L⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Óleo essencial de laranja	-	8,63 ± 0,46	-	-
	1	9,74 ± 0,51	111,1	4,9
	2	10,44 ± 0,52	90,4	4,7
	3	11,60 ± 0,33	99,2	2,7
Óleo essencial de pinho	-	3,74 ± 0,31	-	-
	1	4,87 ± 0,20	112,6	4,0
	2	5,91 ± 0,09	108,3	4,1
	3	6,63 ± 0,07	96,1	2,4

Fonte: elaborado pelo autor.

5 Conclusões

Neste trabalho, um sensor eletroquímico para a determinação enantiosseletiva de (D) e (L)-limoneno foi desenvolvido pela eletropolimerização de filme de PPy na presença das duas moléculas enantioméricas, em superfície de GCE modificado com rGO e AuNPs. Foram feitas caracterizações por meio das técnicas de CV, DPV, EIS, XPS, SEM e EDS, que confirmaram que as modificações na superfície do eletrodo foram realizadas com eficiência e de modo satisfatório, pois apresentaram todas as características já reportadas na literatura.

Todas as otimizações realizadas na construção do sensor permitiram uma melhor resposta analítica, pois foram responsáveis diretamente para obtenção de formação de cavidades seletivas do eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP. Parâmetros como concentração do monômero, quantidade de ciclos de eletropolimerização, pH de eletropolimerização, quantidade de ciclos de extração e tempo de religação foram avaliados pela variação de corrente obtida entre as etapas de extração e religação por meio de DPV.

Após a otimização de todos os parâmetros experimentais, foram construídas as curvas analíticas para ambos os enantiômeros, que apresentaram como faixa de trabalho $2,0 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹ a $1,0 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹, com baixos LD ($1,8 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹ para p (D)-limoneno e $1,4 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹ para o (L)-limoneno).

O estudo de seletividade mostrou que há uma grande afinidade para a molécula de limoneno na superfície do eletrodo, e que apresenta seletividade para o reconhecimento dos enantiômeros desse analito.

O sensor apresentou repetibilidade intra e inter-dia no estudo com 10 medidas realizadas, com desvio padrão abaixo de 5%. O sensor construído também apresentou uma grande estabilidade, pois manteve a corrente inicial em aproximadamente 89% por 16 dias consecutivos.

O eletrodo GCE/rGO/AuNPs/MIP foi aplicado em amostra de óleo essencial de laranja, que é obtido a partir da casca da fruta, e em amostra de óleo essencial de pinho, obtido do fruto. Os valores encontrados de (D)-limoneno em óleo de laranja, composto principal da amostra, foi de 11,7g L⁻¹ e de (L)-limoneno em óleo de pinho, também sendo o composto principal, foi de 0,51 g L⁻¹.

¹. A recuperação variou de 90,5% a 112,6%. Todos os estudos realizados mostram a viabilidade de aplicação do sensor proposto, além de ser possível a sua aplicação para determinação de outros enantiômeros de interesse.

Referências

- [1] Benno Bernardo Kist et al., Anuário Brasileiro de Horti&Fruti 2023, Santa Cruz Do Sul: Editora Gazeta (2023) 1–108. www.buhlergroup.com.
- [2] F. Donadon, D. Santos, A relevância da eco-inovação para resíduos sólidos na agroindústria da fruticultura, *Revista Gestão e Tecnologia* 18 (2018) 205–227. <http://revistagt.fpl.edu.br/>.
- [3] E.M. Coelho, A.C. Viana, L.C. Azevêdo, Prospecção tecnológica para o aproveitamento de resíduos industriais, com foco na indústria de processamento de manga, *Cadernos de Prospecção* 7 (2014) 550–560. <https://doi.org/10.9771/s.cprosp.2014.007.056>.
- [4] B. Satari, K. Karimi, Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization, *Resour Conserv Recycl* 129 (2018) 153–167. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.032>.
- [5] V.A. Bampidis, P.H. Robinson, Citrus by-products as ruminant feeds: A review, *Anim Feed Sci Technol* 128 (2006) 175–217. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.12.002>.
- [6] F.R. Marín, C. Soler-Rivas, O. Benavente-García, J. Castillo, J.A. Pérez-Alvarez, By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres, *Food Chem* 100 (2007) 736–741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.040>.
- [7] I. John, K. Muthukumar, A. Arunagiri, A review on the potential of citrus waste for D-Limonene, pectin, and bioethanol production, *Int J Green Energy* 14 (2017) 599–612. <https://doi.org/10.1080/15435075.2017.1307753>.
- [8] S. Malik, *Essential Oil Research*, Springer International Publishing, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16546-8>.
- [9] M.R.M. Junior, T.A.A.R. e. Silva, G.C. Franchi, A. Nowill, G.M. Pastore, S. Hyslop, Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil, *Food Chem* 116 (2009) 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.084>.
- [10] N. Gültepe, Protective effect of D-limonene derived from orange peel essential oil against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Aquac Rep* 18 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100417>.

- [11] X. Zhao, F. Liu, C. Ma, F. Yuan, Y. Gao, Effect of carrier oils on the physicochemical properties of orange oil beverage emulsions, *Food Research International* 74 (2015) 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.002>.
- [12] A. Wibe, A.-K. Borg-Karlson, M. Persson, T. Norin, H. Mustaparta, Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in some conifers and receptor neuron discrimination of α -pinene and limonene enantiomers in the pine weevil, *Hylobius abietis*, *J Chem Ecol* 24 (1998) 273–287.
- [13] P. Erasto, A.M. Viljoen, Limonene - A Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance, *Nat Prod Commun* 3 (2008) 1193–1202.
- [14] M. Persson, K. Sjödin, A.-K. Borg-Karlson, T. Norin, I. Ekberg, Relative amounts and enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in xylem and needles of *Picea abies*, *Phytochemistry* 42 (1996) 1289–1297.
- [15] S. Kokkini, R. Karousou, T. Lanaras, Essential Oils of Spearmint (Carvone-rich) Plants from the Island of Crete (Greece), *Biochem Syst Ecol* 23 (1995) 425–430.
- [16] R. Kjønaas, R. Croteau, Demonstration that Limonene is the First Cyclic Intermediate in the Biosynthesis of Oxygenated p-Menthane Monoterpenes in *Mentha piperita* and Other *Mentha* Species, *Arch Biochem Biophys* 220 (1983) 79–89.
- [17] C. Deschamps, J.E. Simon, Terpenoid Essential Oil Metabolism in Basil (*Ocimum basilicum* L.) Following Elicitation., *Journal of Essential Oil Research* 18 (2006) 618–621. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699183>.
- [18] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans., International Agency for Research on Cancer., Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins., World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1993.
- [19] J.C.R. Demyttenaere, K. Van Belleghem, N. De Kimpe, Biotransformation of (R)-(+)-and (S)-limonene by fungi and the use of solid-phase microextraction for screening, *Phytochemistry* 57 (2001) 199–208. www.elsevier.com/locate/phytochem.
- [20] P. Erasto, A.M. Viljoen, Limonene - A Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance, *Nat Prod Commun* 3 (2008) 1193–1202.

- [21] D.C. Sikdar, R. Menon, K. Duseja, P. Kumar, P. Swami, Extraction of citrus oil from orange (*Citrus sinensis*) peels by steam distillation and its characterizations, n.d. www.ijtra.com.
- [22] S.C. Taneja, S. Chandra, Mint, in: *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition*, Elsevier Inc., 2012: pp. 366–387. <https://doi.org/10.1533/9780857095671.366>.
- [23] J.L. Bicas, I.A. Neri-Numa, A.L.T.G. Ruiz, J.E. De Carvalho, G.M. Pastore, Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors, *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 1610–1615. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.012>.
- [24] M.N. Gould, *Cancer Chemoprevention and Therapy by Monoterpenes*, n.d.
- [25] A.A.C. De Almeida, R.B.F. De Carvalho, O.A. Silva, D.P. De Sousa, R.M. De Freitas, Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test, *Pharmacol Biochem Behav* 118 (2014) 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.01.006>.
- [26] N.G.P.B. Lima, D.P. De Sousa, F.C.F. Pimenta, M.F. Alves, F.S. De Souza, R.O. MacEdo, R.B. Cardoso, L.C.S.L. De Moraes, M.D.F.F. Melo Diniz, R.N. De Almeida, Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants, *Pharmacol Biochem Behav* 103 (2013) 450–454. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.09.005>.
- [27] S.R.L. Santos, M.A. Melo, A.V. Cardoso, R.L.C. Santos, D.P. de Sousa, S.C.H. Cavalcanti, Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn, *Chemosphere* 84 (2011) 150–153. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.018>.
- [28] R.R. Kurdelas, S. López, B. Lima, G.E. Feresin, J. Zygodlo, S. Zacchino, M.L. López, A. Tapia, M.L. Freile, Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia, *Ind Crops Prod* 40 (2012) 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.024>.
- [29] C. Ravichandran, P.C. Badgujar, P. Gundev, A. Upadhyay, Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive, *Food and Chemical Toxicology* 120 (2018) 668–680. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.052>.

- [30] J. Hajagos-Tóth, Á. Hódi, A.B. Seres, R. Gáspár, Effects of d- and l-limonene on the pregnant rat myometrium in vitro, *Croat Med J* 56 (2015) 431–438. <https://doi.org/10.3325/cmj.2015.56.431>.
- [31] P. Wolkoff, T. Schneider, J. Kildesø, R. Degerth, M. Jaroszewski, H. Schunk, Risk in cleaning: chemical and physical exposure, *Sci Total Environ* 215 (1998) 135156.
- [32] H. Knoppel, H. Schauenburg, Screening of household products for the emission of volatile organic compounds, *Environ Int* 15 (1989) 413–418.
- [33] S.M. Tasirin, I. Puspasari, A.Z. Sahalan, M. Mokhtar, M.K.A. Ghani, Z. Yaakob, Drying of *Citrus sinensis* Peels in an Inert Fluidized Bed: Kinetics, Microbiological Activity, Vitamin C, and Limonene Determination, *Drying Technology* 32 (2014) 497–508. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.838782>.
- [34] J.A. Miller, I.A. Hakim, C. Thomson, P. Thompson, H.H. Sherry Chow, Determination of d-limonene in adipose tissue by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 870 (2008) 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.06.002>.
- [35] C. Chen, Y. Sheng, Y. Hu, J. Sun, W. Li, H. Feng, L. Tang, Determination of d-limonene in mice plasma and tissues by a new GC–MS/MS method: Comparison of the pharmacokinetics and tissue distribution by oral and inhalation administration in mice, *Biomedical Chromatography* 33 (2019). <https://doi.org/10.1002/bmc.4530>.
- [36] E.A. Ibrahim, M. Wang, M.M. Radwan, A.S. Wanas, C.G. Majumdar, B. Avula, Y.H. Wang, I.A. Khan, S. Chandra, H. Lata, G.M. Hadad, R.A. Abdel Salam, A.K. Ibrahim, S.A. Ahmed, M.A. Elsohly, Analysis of Terpenes in *Cannabis sativa* L Using GC/MS: Method Development, Validation, and Application, *Planta Med* 85 (2019) 431–438. <https://doi.org/10.1055/a-0828-8387>.
- [37] Y.F. Wong, R.N. West, S.T. Chin, P.J. Marriott, Evaluation of fast enantioselective multidimensional gas chromatography methods for monoterpene compounds: Authenticity control of Australian tea tree oil, *J Chromatogr A* 1406 (2015) 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.036>.
- [38] B. Güzel, O. Canlı, S. Murat Hocaoglu, Method development and validation for accurate and sensitive determination of terpenes in bio-based (citrus) oils by

- single quadrupole gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), *Microchemical Journal* 191 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108903>.
- [39] C. Huang, C. Bian, L. Wang, W. Zhou, Y. Li, B. Li, Development and validation of a method for determining D-limonene and its oxidation products in vegetables and soil using GC–MS, *Microchemical Journal* 179 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107470>.
- [40] F.P. Camargo, A. Sarti, A.C. Alécio, C.A. Sabatini, M.A. Tallarico Adorno, I.C. Silveira Duarte, M.B. Amâncio Varesche, Limonene quantification by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and its effects on hydrogen and volatile fatty acids production in anaerobic reactors, *Quim Nova* 43 (2020) 844–850. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170557>.
- [41] N. Fernández, D.A. Lanosa, N.S. Janezic, P.N. Quiroga, Development and validation of a GC-MS method for quantification of terpenes in cannabis oil (*Cannabis sativa* L.). Application to commercially available preparations in Argentina, *J Appl Res Med Aromat Plants* 35 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2023.100466>.
- [42] S. Wang, Y. Chen, Z. Gao, M. Xiong, Z. Zhong, L. Ye, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of d-limonene in human plasma, *J Pharm Biomed Anal* 44 (2007) 1095–1099. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.04.018>.
- [43] Y. Zhu, C.Y. Shao, H.P. Lv, Y. Zhang, W.D. Dai, L. Guo, J.F. Tan, Q.H. Peng, Z. Lin, Enantiomeric and quantitative analysis of volatile terpenoids in different teas (*Camellia sinensis*), *J Chromatogr A* 1490 (2017) 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.013>.
- [44] Y. Ruíz-García, J.A. Pino, L. Lami, Y. Martínez-Pérez, Development and Validation of a Solid-Phase Microextraction Method for the Determination of Total Flavouring Content in Encapsulated Flavouring, *Food Anal Methods* 8 (2015) 2228–2234. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0093-y>.
- [45] A. Godayol, M. Alonso, J.M. Sanchez, E. Anticó, Odour-causing compounds in air samples: Gas-liquid partition coefficients and determination using solid-phase microextraction and GC with mass spectrometric detection, *J Sep Sci* 36 (2013) 1045–1053. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200727>.
- [46] U. Kotowska, M. Żalikowski, V.A. Isidorov, HS-SPME/GC-MS analysis of volatile and semi-volatile organic compounds emitted from municipal sewage sludge,

Environ Monit Assess 184 (2012) 2893–2907. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2158-8>.

- [47] X.B. Xu, K. Murtada, J. Pawliszyn, Determination of selected volatile terpenes in fish samples via solid phase microextraction arrow coupled with GC-MS, *Talanta* 221 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121446>.
- [48] M.T. Lisanti, J. Laboyrie, S. Marchand-Marion, G. de Revel, L. Moio, L. Riquier, C. Franc, Minty aroma compounds in red wine: Development of a novel automated HS-SPME-arrow and gas chromatography-tandem mass spectrometry quantification method, *Food Chem* 361 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130029>.
- [49] G.P. Blanch, G.J. Nicholson, Determination of the Enantiomeric Composition of Limonene and Limonene-1,2-epoxide in Lemon Peel by Multidimensional Gas Chromatography with Flame-Ionization Detection and Selected Ion Monitoring Mass Spectrometry, 1998. <https://academic.oup.com/chromsci/article/36/1/37/346752>.
- [50] F. Kardani, A. Daneshfar, R. Sahrae, M. Ghaedi, Application of coacervative microextraction for extraction of volatile compounds in thymus essential oil and fruit juices by gas chromatography with flame ionization detection), *Journal of Essential Oil Research* 23 (2011) 61–69. <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9712284>.
- [51] S. Giovannoni, C. Lancioni, C. Vaccarini, D. Sedan, D. Andrinolo, C. Castells, Determination of variability of terpenes and terpenoids in *Cannabis sativa* by gas chromatography-flame ionization detection and gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A* 1687 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463669>.
- [52] A. Ramzi, H. Ahmadi, I. Sadiktsis, U. Nilsson, A two-dimensional non-comprehensive reversed/normal phase high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry system for determination of limonene and linalool hydroperoxides, *J Chromatogr A* 1566 (2018) 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.056>.
- [53] C. Villa, R. Gambaro, E. Mariani, S. Dorato, High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance

allergens to study scented products, *J Pharm Biomed Anal* 44 (2007) 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.020>.

- [54] J. Rudbäck, N. Islam, U. Nilsson, A.T. Karlberg, A sensitive method for determination of allergenic fragrance terpene hydroperoxides using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J Sep Sci* 36 (2013) 1370–1378. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200855>.
- [55] M.W. Bernart, Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) method for the determination of limonene in sweet orange (*Citrus sinensis*) oil: Implications for limonene stability, *J AOAC Int* 98 (2015) 94–97. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-157>.
- [56] T. Wen, M. Sang, M. Wang, L. Han, Z. Gong, X. Tang, X. Long, H. Xiong, H. Peng, Rapid detection of d-limonene emanating from citrus infestation by *Bactrocera dorsalis* (Hendel) using a developed gas-sensing system based on QCM sensors coated with ethyl cellulose, *Sens Actuators B Chem* 328 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129048>.
- [57] J. Völkle, K. Kumpf, A. Feldner, P. Lieberzeit, P. Fruhmann, Development of conductive molecularly imprinted polymers (cMIPs) for limonene to improve and interconnect QCM and chemiresistor sensing, *Sens Actuators B Chem* 356 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131293>.
- [58] B. Ghatak, S.B. Ali, H. Naskar, B. Tudu, P. Pramanik, S. Mukherji, R. Bandyopadhyay, Selective and Sensitive Detection of Limonene in Mango using Molecularly Imprinted Polymer Based Quartz Crystal Microbalance Sensor, in: Conference: 2019 IEEE International Symposium on Olfaction and Electronic Nose (ISOEN), 2019: pp. 1–3.
- [59] C. Fietzek, T. Hermle, W. Rosenstiel, V. Schurig, Chiral discrimination of limonene by use of β -cyclodextrin-coated quartz-crystal-microbalances (QCMs) and data evaluation by artificial neuronal networks, *Anal Bioanal Chem* 371 (2001) 58–63. <https://doi.org/10.1007/s002160100899>.
- [60] M. Kikuchi, N. Tsuru, S. Shiratori, Recognition of terpenes using molecular imprinted polymer coated quartz crystal microbalance in air phase, *Sci Technol Adv Mater* 7 (2006) 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.stam.2005.12.004>.

- [61] V. Shumeiko, Y. Paltiel, G. Bisker, Z. Hayouka, O. Shoseyov, A nanoscale paper-based near-infrared optical nose (NIRON), *Biosens Bioelectron* 172 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112763>.
- [62] A.R. Niculae, R.I. Stefan-van Staden, J.F. van Staden, R. Georgescu State, Sulfur-Doped Graphene-Based Electrochemical Sensors for Fast and Sensitive Determination of (R)-(+)-Limonene from Beverages, *Sensors* 22 (2022). <https://doi.org/10.3390/s22155851>.
- [63] N.U. Nazir, S.R. Abbas, H. Nasir, I. Hussain, Electrochemical sensing of limonene using thiol capped gold nanoparticles and its detection in the real breath sample of a cirrhotic patient, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 905 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115977>.
- [64] C. Homma, M. Tsukiiwa, H. Noguchi, M. Tanaka, M. Okochi, H. Tomizawa, Y. Sugizaki, A. Isobayashi, Y. Hayamizu, Designable peptides on graphene field-effect transistors for selective detection of odor molecules, *Biosens Bioelectron* 224 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.115047>.
- [65] K.A. Weerakoon, B. Chin, Detecting Insect Infestation Using a Carbon/Polymer Composite Based Sensor Array, *ECS Trans* 33 (2010) 85–89. <https://doi.org/10.1149/1.3484110>.
- [66] A. Rossi, E. Spagnoli, F. Tralli, M. Marzocchi, V. Guidi, B. Fabbri, New Approach for the Detection of Sub-ppm Limonene: An Investigation through Chemoresistive Metal-Oxide Semiconductors, *Sensors* 23 (2023). <https://doi.org/10.3390/s23146291>.
- [67] M.A. Beluomini, J.L. da Silva, A.C. de Sá, E. Buffon, T.C. Pereira, N.R. Stradiotto, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymer on nanostructured carbon materials: A review, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 840 (2019) 343–366. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.005>.
- [68] M.A. Beluomini, J.L. da Silva, N.R. Stradiotto, Amperometric determination of myo-inositol by using a glassy carbon electrode modified with molecularly imprinted polypyrrole, reduced graphene oxide and nickel nanoparticles, *Microchimica Acta* 185 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2710-0>.
- [69] N.R. Stradiotto, H. Yamanaka, M. Valnice, B. Zanoni, *Electrochemical Sensors: A Powerful Tool in Analytical Chemistry*, 2003.

- [70] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry: principles, methods, and applications*, Oxford University Press, 1993.
- [71] F.R. Simões, M.G. Xavier, *Electrochemical Sensors*, in: *Nanoscience and Its Applications*, 2017: pp. 155–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0/00006-5>.
- [72] M. de F.B. Souza, Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem, *Quim Nova* 20 (1997) 191–195.
- [73] A. Cirocka, D. Zarzeczańska, A. Wcisło, Good choice of electrode material as the key to creating electrochemical sensors-characteristics of carbon materials and transparent conductive oxides (TCO), *Materials* 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/ma14164743>.
- [74] K.R. Ratinac, W. Yang, J.J. Gooding, P. Thordarson, F. Braet, Graphene and related materials in electrochemical sensing, *Electroanalysis* 23 (2011) 803–826. <https://doi.org/10.1002/elan.201000545>.
- [75] P.S. Sharma, M. Dabrowski, K. Noworyta, T.P. Huynh, C.B. KC, J.W. Sobczak, P. Pieta, F. D'Souza, W. Kutner, Fullerene derived molecularly imprinted polymer for chemosensing of adenosine-5'-triphosphate (ATP), *Anal Chim Acta* 844 (2014) 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.005>.
- [76] G. Lota, K. Fic, E. Frackowiak, Carbon nanotubes and their composites in electrochemical applications, *Energy Environ Sci* 4 (2011) 1592–1605. <https://doi.org/10.1039/c0ee00470g>.
- [77] W.Q. Lim, Z. Gao, Metal Oxide Nanoparticles in Electroanalysis, *Electroanalysis* 27 (2015) 2074–2090. <https://doi.org/10.1002/elan.201500024>.
- [78] F.W. Campbell, R.G. Compton, The use of nanoparticles in electroanalysis: An updated review, *Anal Bioanal Chem* 396 (2010) 241–259. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3063-7>.
- [79] K. Haupt, K. Mosbach, Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors, *Chem Rev* 100 (2000) 2495–2504. <https://doi.org/10.1021/cr990099w>.
- [80] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, Molecular imprinting: Perspectives and applications, *Chem Soc Rev* 45 (2016) 2137–2211. <https://doi.org/10.1039/c6cs00061d>.

- [81] M. Noel, P.N. Anantharaman, Voltammetric studies on glassy carbon electrodes: electrochemical behaviour of glassy carbon electrodes in H₂SO₄, Na₂SO₄ and NaOH media, *Surf Coat Technol* 28 (1986) 161–179.
- [82] 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. <https://doi.org/10.1002/elan.200900571>.
- [83] K. Tadyszak, J.K. Wychowaniec, J. Litowczenko, Biomedical applications of graphene-based structures, *Nanomaterials* 8 (2018). <https://doi.org/10.3390/nano8110944>.
- [84] S.J. Rowley-Neale, E.P. Randviir, A.S. Abo Dena, C.E. Banks, An overview of recent applications of reduced graphene oxide as a basis of electroanalytical sensing platforms, *Appl Mater Today* 10 (2018) 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.11.010>.
- [85] S.H. Dave, C. Gong, A.W. Robertson, J.H. Warner, J.C. Grossman, Chemistry and Structure of Graphene Oxide via Direct Imaging, *ACS Nano* 10 (2016) 7515–7522. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02391>.
- [86] D.R. Dreyer, C.W. Bielawski, Carbocatalysis: Heterogeneous carbons finding utility in synthetic chemistry, *Chem Sci* 2 (2011) 1233–1240. <https://doi.org/10.1039/c1sc00035g>.
- [87] J. Filip, J. Tkac, Is graphene worth using in biofuel cells?, *Electrochim Acta* 136 (2014) 340–354. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.05.119>.
- [88] H. Bai, C. Li, G. Shi, Functional composite materials based on chemically converted graphene, *Advanced Materials* 23 (2011) 1089–1115. <https://doi.org/10.1002/adma.201003753>.
- [89] M. Zhou, Y. Zhai, S. Dong, Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide, *Anal Chem* 81 (2009) 5603–5613. <https://doi.org/10.1021/ac900136z>.
- [90] O.C. Compton, S.T. Nguyen, Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: Versatile building blocks for carbon-based materials, *Small* 6 (2010) 711–723. <https://doi.org/10.1002/smll.200901934>.
- [91] M. Auffan, J. Rose, J.Y. Bottero, G. V. Lowry, J.P. Jolivet, M.R. Wiesner, Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety

- perspective, *Nat Nanotechnol* 4 (2009) 634–641. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.242>.
- [92] C.M. Welch, R.G. Compton, The use of nanoparticles in electroanalysis: A review, *Anal Bioanal Chem* 384 (2006) 601–619. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0230-3>.
- [93] A. Yu, Z. Liang, J. Cho, F. Caruso, Nanostructured electrochemical sensor based on dense gold nanoparticle films, *Nano Lett* 3 (2003) 1203–1207. <https://doi.org/10.1021/nl034363j>.
- [94] K. Saha, S.S. Agasti, C. Kim, X. Li, V.M. Rotello, Gold nanoparticles in chemical and biological sensing, *Chem Rev* 112 (2012) 2739–2779. <https://doi.org/10.1021/cr2001178>.
- [95] J.M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochim Acta* 53 (2008) 5848–5866. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.005>.
- [96] M.A. Beluomini, J.L. da 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. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.040>.
- [97] F. Li, F. Wu, X. Luan, Y. Yuan, L. Zhang, G. Xu, W. Niu, Highly enantioselective electrochemical sensing based on helicoid Au nanoparticles with intrinsic chirality, *Sens Actuators B Chem* 362 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131757>.
- [98] A. Afkhami, F. Kafrashi, M. Ahmadi, T. Madrakian, A new chiral electrochemical sensor for the enantioselective recognition of naproxen enantiomers using L - cysteine self-assembled over gold nanoparticles on a gold electrode , *RSC Adv* 5 (2015) 58609–58615. <https://doi.org/10.1039/c5ra07396k>.
- [99] S. Ioan Adrian, I. Bogdan-Cezar, O. Radu, B. Ede, Chiral electrochemical sensing of propranolol enantiomers on D/L-Cys modified gold nanoparticles, *Electrochim Acta* (2024) 144608. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2024.144608>.
- [100] Q. Zhang, L. Guo, Y. Huang, Y. Chen, D. Guo, C. Chen, Y. Fu, An electrochemical chiral sensing platform for propranolol enantiomers based on size-controlled gold nanocomposite, *Sens Actuators B Chem* 199 (2014) 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.03.059>.

- [101] L. Chen, S. Liu, F. Chang, X. Xie, Z. Zhu, A Gold Nanoparticles–Enhanced Carbon Nanotubes Electrochemical Chiral Sensor, *Electroanalysis* 29 (2017) 955–959. <https://doi.org/10.1002/elan.201600747>.
- [102] C. Malitesta, E. Mazzotta, R.A. Picca, A. Poma, I. Chianella, S.A. Piletsky, MIP sensors - The electrochemical approach, *Anal Bioanal Chem* 402 (2012) 1827–1846. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5405-5>.
- [103] J.Z. Hilt, M.E. Byrne, Configurational biomimesis in drug delivery: Molecular imprinting of biologically significant molecules, *Adv Drug Deliv Rev* 56 (2004) 1599–1620. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.04.002>.
- [104] M.M. Moein, Advancements of chiral molecularly imprinted polymers in separation and sensor fields: A review of the last decade, *Talanta* 224 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121794>.
- [105] O.S. Ahmad, T.S. Bedwell, C. Esen, A. Garcia-Cruz, S.A. Piletsky, Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors, *Trends Biotechnol* 37 (2019) 294–309. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.009>.
- [106] S. Jafari, M. Dehghani, N. Nasirizadeh, M. Azimzadeh, An azithromycin electrochemical sensor based on an aniline MIP film electropolymerized on a gold nano urchins/graphene oxide modified glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 829 (2018) 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.09.053>.
- [107] E. Buffon, N.R. Stradiotto, Using a disposable platform based on reduced graphene oxide, iron nanoparticles and molecularly imprinted polymer for voltammetric determination of vanillic acid in fruit peels, *Food Chem* 397 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133786>.
- [108] J.L. da Silva, E. Buffon, M.A. Beluomini, L.A. Pradela-Filho, D.A. Gouveia Araújo, A.L. Santos, R.M. Takeuchi, N.R. Stradiotto, Non-enzymatic lactose molecularly imprinted sensor based on disposable graphite paper electrode, *Anal Chim Acta* 1143 (2021) 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.030>.
- [109] M.F. Falone, E. Buffon, N.R. Stradiotto, Molecularly imprinted electrochemical sensor for monitoring mercaptan sulfur in aviation biofuel, *Fuel* 307 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121783>.

- [110] L. Moreira Gonçalves, Electropolymerized molecularly imprinted polymers: perceptions based on recent literature for soon-to-be world-class scientists, *Curr Opin Electrochem* 25 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.09.007>.
- [111] L. Zhang, G. Wang, C. Xiong, L. Zheng, J. He, Y. Ding, H. Lu, G. Zhang, K. Cho, L. Qiu, Chirality detection of amino acid enantiomers by organic electrochemical transistor, *Biosens Bioelectron* 105 (2018) 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.035>.
- [112] R. Ouyang, J. Lei, H. Ju, Y. Xue, A molecularly imprinted copolymer designed for enantioselective recognition of glutamic acid, *Adv Funct Mater* 17 (2007) 3223–3230. <https://doi.org/10.1002/adfm.200700143>.
- [113] D. Duan, H. Yang, Y. Ding, L. Li, G. Ma, A three-dimensional conductive molecularly imprinted electrochemical sensor based on MOF derived porous carbon/carbon nanotubes composites and prussian blue nanocubes mediated amplification for chiral analysis of cysteine enantiomers, *Electrochim Acta* 302 (2019) 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.02.028>.
- [114] L. Zhang, Z. Liu, C. Xiong, L. Zheng, Y. Ding, H. Lu, G. Zhang, L. Qiu, Selective recognition of Histidine enantiomers using novel molecularly imprinted organic transistor sensor, *Org Electron* 61 (2018) 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.orgel.2018.05.063>.
- [115] H. Hou, S. Tang, W. Wang, M. Liu, A. Liang, L. Sun, A. Luo, Electrochemical Enantioanalysis of D- and L-Cysteine with a Dual-Template Molecularly Imprinted Sensor, *J Electrochem Soc* 169 (2022) 037506. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac58c0>.
- [116] B.B. Prasad, S. Jaiswal, K. Singh, Ultra-trace analysis of D-and L-aspartic acid applying one-by-one approach on a dual imprinted electrochemical sensor, *Sens Actuators B Chem* 240 (2017) 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.031>.
- [117] S. Jaiswal, R. Singh, K. Singh, S. Fatma, B.B. Prasad, Enantioselective analysis of D- and L- Serine on a layer-by-layer imprinted electrochemical sensor, *Biosens Bioelectron* 124–125 (2019) 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.090>.
- [118] W.J. Cheong, F. Ali, J.H. Choi, J.O. Lee, K. Yune Sung, Recent applications of molecular imprinted polymers for enantio-selective recognition, *Talanta* 106 (2013) 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.049>.

- [119] M.P. Tiwari, A. Prasad, Molecularly imprinted polymer based enantioselective sensing devices: A review, *Anal Chim Acta* 853 (2015) 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.011>.
- [120] F. Canfarotta, R. Rapini, S. Piletsky, Recent advances in electrochemical sensors based on chiral and nano-sized imprinted polymers, *Curr Opin Electrochem* 7 (2018) 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.11.018>.
- [121] Z. Iskierko, A. Checinska, P.S. Sharma, K. Golebiewska, K. Noworyta, P. Borowicz, K. Fronc, V. Bandi, F. D'Souza, W. Kutner, Molecularly imprinted polymer based extended-gate field-effect transistor chemosensors for phenylalanine enantioselective sensing, *J Mater Chem C Mater* 5 (2017) 969–977. <https://doi.org/10.1039/c6tc03812c>.
- [122] X. Wang, J. Chen, H. Xu, Y. Fan, X. Wang, M. Zhang, Y. Liu, B. Li, J. Liu, H. Zhou, Construction of an ultrasensitive dual-mode chiral molecules sensing platform based on molecularly imprinted polymer modified bipolar electrode, *Biosens Bioelectron* 243 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115759>.
- [123] B.B. Prasad, I. Pandey, Metal incorporated molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensor for enantio-selective analysis of pyroglutamic acid isomers, *Sens Actuators B Chem* 186 (2013) 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.06.041>.
- [124] B.B. Prasad, A. Srivastava, M.P. Tiwari, Molecularly imprinted polymer-matrix nanocomposite for enantioselective electrochemical sensing of d- and l-aspartic acid, *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 4071–4080. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.052>.
- [125] B.B. Prasad, A. Srivastava, M.P. Tiwari, Highly sensitive and selective hyphenated technique (molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction-molecularly imprinted polymer sensor) for ultra trace analysis of aspartic acid enantiomers, *J Chromatogr A* 1283 (2013) 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.096>.
- [126] 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. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.10.095>.

- [127] B.B. Prasad, I. Pandey, A. Srivastava, D. Kumar, M.P. Tiwari, Multiwalled carbon nanotubes-based pencil graphite electrode modified with an electrosynthesized molecularly imprinted nanofilm for electrochemical sensing of methionine enantiomers, *Sens Actuators B Chem* 176 (2013) 863–874. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.09.050>.
- [128] B.B. Prasad, A. Srivastava, I. Pandey, M.P. Tiwari, Electrochemically grown imprinted polybenzidine nanofilm on multiwalled carbon nanotubes anchored pencil graphite fibers for enantioselective micro-solid phase extraction coupled with ultratrace sensing of d- and l-methionine, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 912 (2013) 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.10.010>.
- [129] B.B. Prasad, M.P. Tiwari, R. Madhuri, P.S. Sharma, Enantioselective quantitative separation of d- and l-thyroxine by molecularly imprinted micro-solid phase extraction silver fiber coupled with complementary molecularly imprinted polymer-sensor, *J Chromatogr A* 1217 (2010) 4255–4266. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.055>.
- [130] B.B. Prasad, R. Madhuri, M.P. Tiwari, P.S. Sharma, Layer-by-layer assembled molecularly imprinted polymer modified silver electrode for enantioselective detection of d- and l-thyroxine, *Anal Chim Acta* 681 (2010) 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.027>.
- [131] S. Fireman-Shoresh, I. Turyan, D. Mandler, D. Avnir, S. Marx, Chiral electrochemical recognition by very thin molecularly imprinted sol-gel films, *Langmuir* 21 (2005) 7842–7847. <https://doi.org/10.1021/la050240y>.
- [132] X. Niu, X. Yang, Z. Mo, Z. Pan, Z. Liu, C. Shuai, Q. Gao, N. Liu, R. Guo, Electrochemical Chiral Recognition at Molecular Imprinting Au Surfaces, *J Electrochem Soc* 166 (2019) B1126–B1130. <https://doi.org/10.1149/2.1371912jes>.
- [133] A. Sukswan, L. Lomlim, F.L. Dickert, R. Suedee, Tracking the chemical surface properties of racemic thalidomide and its enantiomers using a biomimetic functional surface on a quartz crystal microbalance, *J Appl Polym Sci* 132 (2015). <https://doi.org/10.1002/app.42309>.
- [134] I. Pandey, R. Kant, Electrochemical impedance based chiral analysis of anti-ascorbic drug: L-Ascorbic acid and d-ascorbic acid using C-dots decorated

- conductive polymer nano-composite electrode, *Biosens Bioelectron* 77 (2016) 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.039>.
- [135] B.B. Prasad, I. Pandey, Molecularly imprinted polymer-based piezoelectric sensor for enantio-selective analysis of malic acid isomers, *Sens Actuators B Chem* 181 (2013) 596–604. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.02.060>.
- [136] T.C. Pereira, N.R. Stradiotto, Electrochemical sensing of lactate by using an electrode modified with molecularly imprinted polymers, reduced graphene oxide and gold nanoparticles, *Microchimica Acta* 186 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3898-3>.
- [137] E. Buffon, N.R. Stradiotto, A molecularly imprinted polymer on reduced graphene oxide-gold nanoparticles modified screen-printed electrode for selective determination of ferulic acid in orange peels, *Microchemical Journal* 167 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106339>.
- [138] W. Zhang, A.D. Bas, E. Ghali, Y. Choi, Passive behavior of gold in sulfuric acid medium, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)* 25 (2015) 2037–2046. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(15\)63813-4](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(15)63813-4).
- [139] J.N. Gaur, G.M. Schmid, *Electrochemical behavior of gold in acidic chloride solutions*, 1970.
- [140] S. Eissa, M. Zourob, Competitive voltammetric morphine immunosensor using a gold nanoparticle decorated graphene electrode, *Microchimica Acta* 184 (2017) 2281–2289. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2261-9>.
- [141] X. Tan, Q. Hu, J. Wu, X. Li, P. Li, H. Yu, X. Li, F. Lei, Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer reduced graphene oxide and gold nanoparticles modified electrode for detection of carbofuran, *Sens Actuators B Chem* 220 (2015) 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.048>.
- [142] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, Wiley, New York, 2001.
- [143] C.G. Zoski, *Handbook of Electrochemistry*, Elsevier, Las Cruces, New Mexico, 2007. www.daihoc.com.vn.
- [144] M.M. Gvozdenović, B.Z. Jugović, J.S. Stevanović, B.N. Grgur, Electrochemical synthesis of electroconducting polymers, *Hem Ind* 68 (2014) 673–684. <https://doi.org/10.2298/HEMIND131122008G>.

- [145] Y. Li, R. Qian, Electrochemical overoxidation of conducting polypyrrole nitrate film in aqueous solutions, 2000. www.elsevier.nl/locate/electacta.
- [146] Z. Gao, M. Zi, B. Chen, The influence of overoxidation treatment on the permeability of polypyrrole films, 1994.
- [147] B.G. Olsen, M.F. Falone, E. Buffon, I. Yoshimura, R. da S. Vale, J. Contiero, N.R. Stradiotto, Alternative method for rhamnolipids quantification using an electrochemical platform based on reduced graphene oxide, manganese nanoparticles and molecularly imprinted Poly(L-Ser), *Talanta* 272 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.125778>.
- [148] D. Briggs, M.P. Seah, Practical Surface Analysis, Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy, John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido, 1990.
- [149] A.V. Naumkin, A. Kraut-Vass, S.W. Gaarenstroom, C.J. Powell, NIST X-Ray Photoelectron Spectroscopy Database.