

MAÍSA AZEVEDO BELUOMINI

**Sensores eletroquímicos para determinação de polióis na vinhaça de cana-de-açúcar baseados em eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos em grafeno contendo nanopartículas metálicas**

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

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

Araraquara

FICHA CATALOGRÁFICA

B425s	<p>Beluomini, Máisa Azevedo</p> <p>Sensores eletroquímicos para determinação de polióis na vinhaça da cana-de-açúcar baseados em eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos em grafeno contendo nanopartículas metálicas / Máisa Azevedo Beluomini. – Araraquara : [s.n.], 2018 152 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Nelson Ramos Stradiotto</p> <p>1. Óxidos metálicos. 2. Grafeno. 3. Impressão molecular. 4. Eletrodeposição. 5. Polióis. I. Título.</p>
-------	--

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

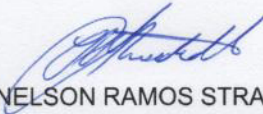
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

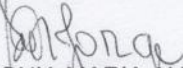
TÍTULO DA TESE: "Sensores eletroquímicos para determinação de polióis na vinhaça de cana-de-açúcar baseados em eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos em grafeno contendo nanopartículas metálicas"


**AUTORA: MAÍSA AZEVEDO BELUOMINI**

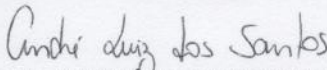
**ORIENTADOR: NELSON RAMOS STRADIOTTO**

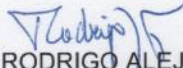
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. NELSON RAMOS STRADIOTTO  
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Profa. Dra. SONIA MARIA ALVES JORGE  
Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu

  
Prof. Dr. LEONARDO LATARO PAIM  
Departamento de Engenharia de Energia / Campus Experimental de Rosana - UNESP - Rosana

  
Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ DOS SANTOS  
Curso de Química / Faculdade de Ciências Integradas do Pontal - UFU - Ituiutaba

  
Prof. Dr. RODRIGO ALEJANDRO ABARZA MUNOZ  
Universidade Federal de Uberlândia / Instituto de Química - UFU - Uberlândia

Araraquara, 23 de março de 2018

## **DADOS CURRICULARES**

### **1 DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Maísa Azevedo Beluomini

**Nacionalidade:** Brasileira

**Nascimento:** 25/03/1988

**Naturalidade** Orlandia – SP

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

**Telefone** (16) 3301-9581

**Endereço eletrônico** mabeluomini@gmail.com

### **2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO**

**2014 - 2018**      **Doutorado em Química**

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

Título: " Sensores eletroquímicos para determinação de polióis na vinhaça de cana-de-açúcar baseados em eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos em grafeno contendo nanopartículas metálicas”.

Orientador: Prof. Nelson Ramos Stradiotto

**2017 - 2017**      **Estágio de Pesquisa no Exterior** (Processo nº 88881.135116/2016-01).  
University of Ca' Foscari – Veneza, Itália.

Título: "Desenvolvimento de sensor eletroquímico baseado em polímeros molecularmente impressos em eletrodos modificados com nanofios de ouro para determinação de L-arabitol em vinhaça de cana-de-açúcar.

Orientadores: Prof. Nelson Ramos Stradiotto e Prof. Paolo Ugo.

**2011 - 2013**      **Mestrado em Química**

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

Título: "Detecção eletroquímica de ácidos urônicos presentes fibra do bagaço de cana-de-açúcar utilizando eletrodo modificado com nanopartículas de cobre em técnica de HPLC”.

Orientador: Prof. Nelson Ramos Stradiotto

**2006 - 2011**      **Graduação em Química**

Universidade Federal de Uberlândia, UFU.

Uberlândia, Brasil.

Título do trabalho de Iniciação Científica: “Produção de Biodiesel a partir de óleo de canola em conjunto com a Rede de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Biocombustíveis de Minas Gerais”.

Orientador: Manuel Gonzalo Hernández-Terrones (*in memoriam*).

### 3 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. **Beluomini, M.A.**; Silva, J.L.; Stradiotto, N.R. Amperometric determination of myo-inositol by using a glassy carbon electrode modified with molecularly imprinted polypyrrole, reduced graphene oxide and nickel nanoparticles. *Microchemica Acta*. 2018. DOI 10.1007/s00604-018-2710-0
2. Freitas, P.V.; Da Silva, D.R.; **Beluomini, M.A.**; Da Silva, J.L.; Stradiotto, N.R. Determination of phenolic acids in sugarcane vinasse by HPLC with pulse amperometry. *Journal of analytical methods in chemistry*, p. 1-10, 2018.
3. **Beluomini, M.A.**; Da Silva, J.L.; Sedenho, G.C.; Stradiotto, N.R. D-mannitol sensor based on molecularly imprinted polymer on electrode modified with reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles. *Talanta*, v. 165, p. 231-239, 2017.
4. Sedenho, G.C.; Da Silva, J.L.; **Beluomini, M.A.**; De Sá, A. C.; Stradiotto, N.R. Determination of electroactive organic acids in sugarcane vinasse by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection using a nickel nanoparticle modified boron-doped diamond. *Energy & Fuels*, v. 31, p. 2865-2870, 2017.
5. Da Silva, J.L.; **Beluomini, M.A.**; Sedenho, G.C.; Stradiotto, N.R. Determination of amino acids in sugarcane vinasse by ion chromatographic using nickel nanoparticles on reduced graphene oxide modified electrode. *Microchemical Journal*, v. 134, p. 374-382, 2017.
6. Moreira, L.F.P.P.; **Beluomini, M.A.**; De Souza, J.C.; Stradiotto, N.R. Study of the Electrochemical Behavior of Biodiesel Microemulsion. *Electroanalysis*, v. 29, p. 1941-1949, 2017.
7. **Beluomini, M. A.**; Silva, J.L.; Stradiotto, N.R. Determination of uronic acids in sugarcane bagasse by anion-exchange chromatography using an electrode modified with copper nanoparticles. *Anal. Methods*, v. 7, p. 2347–2353, 2015.

8. Silva, J.L.; **Beluomini, M.A.**; Stradiotto, N.R. Determination of furanic aldehydes in sugarcane bagasse by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection using a modified electrode with nickel nanoparticles. *Journal of Separation Science*, v. 38, p. 3176-3182, 2015.

9. De souza, J.C.; Toci, A. T.; **Beluomini, M.A.**; Eiras, S.P. Spectrophotometric Determination of Copper(II) in Sugarcane Spirit Using 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and a Homogeneous Ternary Mixture of the Solvents Water, Ethanol and Methyl Isobutyl Ketone. *Revista Virtual de Química*, v. 8, p. 687-701, 2016.

10. Batista, A. C. F.; Viera, A.T.; Rodrigues, H.S.; Silva, T.A.; Assunção, R.M.N.; **Beluomini, M.A.**; Rezende, H.P.; Hernandez-Terrones, M.G. Production and physicochemical characterization of methyl and ethyl biodiesel from canola oil. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, v. 8, p. 289-298, 2015.

#### **4 TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS NO PERÍODO**

##### **4.1 Resumos publicados em anais de congressos científicos internacionais**

1. **Beluomini, M.A.**; Stradiotto, N.R.; UGO, P. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer and 3D-ensembles of gold nanowires for L-arabitol detection. **In: 24th Young Investigators Seminar on Analytical Chemistry**, Veneza, Itália, 2017.

2. **Beluomini, M.A.**; Silva J.L.; Stradiotto, N.R. Electrochemical sensors for monitoring of myo-inositol in sugarcane vinasse based on molecularly imprinted polymer and nanostructures. **In: III Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference - BBEST**, Campos do Jordão, 2017.

3. Silva, J.L.; **Beluomini, M.A.**; Stradiotto, N.R. Amino acids determination in sugarcane vinasse by anion-exchange chromatography with electrochemical detection. **In: III Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference - BBEST**, Campos do Jordão. 2017

4. **Beluomini, M.A.**; Silva, J.L.; Stradiotto, N.R. Determination of Uronic Acids in Sugarcane Bagasse by Anion-exchange Chromatography using Electrode Modified with Copper Nanoparticles. **In: 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry**, Lausanne, Switzerland, 2014.

5. Silva, J.L.; **Beluomini, M.A.**; Stradiotto, N.R. Determination of Furan Aldehydes by HPLC-PAD using Electrode Modified with Nickel Nanoparticles in Bagasse sugarcane. **In: 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry**, Lausanne, Switzerland, 2014.

#### **4.2 Resumos publicados em anais de congressos científicos nacionais**

1. Moreira, L.F.P.P.; **Beluomini, M.A.**; Souza, J.C.; Stradiotto, N.R. Estudo do comportamento eletroquímico do par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em microemulsões de biodiesel. **In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica –SIBEE**, Natal, 2017.

2. **Beluomini, M.A.**; Da Silva, J.L.; Stradiotto, N.R. Molecularly imprinted sensor based on electropolymerized poly(o-phenylenediamine) in electrode modified with reduced graphene oxide and gold nanoparticles for d-mannitol determination. **In: 18° Encontro Nacional de Química Analítica**, 2016, Florianópolis. Anais do 18° Enqa, 2016.

3. Freitas, P.V.; Silva, J.L.; **Beluomini, M.A.**; Silva, D.R.; Stradiotto, N.R. Chromatographic determination of polyphenols in sugarcane vinasse using electrochemical detection. **In: 18° Encontro nacional de química analítica**, 2016, Florianópolis. Anais do 18° Enqa, 2016.

4. **Beluomini, M.A.**; Da Silva, J.L.; Stradiotto, N.R. Determinação de polióis em eletrodo modificado com nanopartículas de cobre em grafeno por técnicas voltamétricas. **In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2015, Uberlândia.

5. Silva, J.L.; **Beluomini, M.A.**; Stradiotto, N.R. Anion-exchange chromatographic determination of amino acids in sugarcane vinasse using nickel nanoparticles in reduced graphene oxide modified electrode. **In: 18° Encontro Nacional de Química Analítica**, 2016, Florianópolis. Anais do 18° Enqa, 2016.

6. Ferrari, T.B.; **Beluomini, M.A.**; Stradiotto, N.R. Quantification of major Carbohydrates in Sugarcane Biomass per Deconvolution of peaks using Modified Electrode with Gold Nanoparticles. In: **The energy & Material Research Conference**, 2015, Madrid. The energy & Material Research Conference. Madrid: Formatex research center, 2015. v. 1. p. 41-41.

7. Silva, J.L.; **Beluomini, M.A.**; Stradiotto, N.R. Chromatographic determination of amino acids in sugarcane vinasse using modified electrode with graphene oxide containing nickel nanoparticles. In: **XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Uberlândia, 2015.

8. **Beluomini, M.A.**; Silva, J.L.; Stradiotto, N.R. New method for determination of uronic acids in sugarcane bagasse using HPLC with modified electrode with copper nanoparticles. In: **2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference**. Campos do Jordão, 2014.

9. Silva, J.L.; **Beluomini, M.A.**; Stradiotto, N.R. Determination chromatographic of furanic aldehydes in sugarcane bagasse using modified electrode with nickel nanoparticles. In: **2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference**, Campos do Jordão. 2014.

## **5 CO-ORIENTAÇÃO**

2015 – 2017 - Luiz Felipe Pompeu Prado Moreira. Iniciação científica. Estudo do comportamento eletroquímico do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em microemulsões de biodiesel. UNESP-IQCar.

2014 – 2015 - Tarso Bortolucci Ferrari. Desenvolvimento de novos métodos de caracterização de material lignocelulósico para produção de etanol de segunda geração. UNESP- IQCar.

## **6 OUTRAS INFORMAÇÕES**

2014 - Melhor pôster do II Workshop de Bioenergia - Unesp, II Workshop de Bioenergia - Unesp - Instituto de Pesquisa em Bioenergia, 2014.

*Aos meus pais, Enio e Elisa  
por todo amor, incentivo e confiança.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, força, saúde e bênçãos durante essa trajetória.

Aos meus pais, Enio e Elisa, por todo amor, apoio, valores e por acreditar em mim e nos meus sonhos. Amo muito vocês!

Aos meus avós Santana (*in memoriam*) e Enio, pelo amor, carinho e torcida inestimável.

Aos meus tios, José Luiz e Dulce, por toda ajuda e carinho.

Ao Prof. Nelson Ramos Stradiotto não somente pela grande orientação, mas por toda confiança, incentivo e valiosos ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente.

Às professoras do grupo de eletroanalítica, Maria Valnice Boldrin Zanoni, Hideko Yamanaka e Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, pela amizade, apoio, agradável convivência e contribuições à minha formação acadêmica.

Aos professores membro da banca de qualificação, Profa. Dra. Maria Del Pilar T. Sotomayor e Prof. Dr. Denis Ricardo Martins de Godoi e aos professores membros da banca de defesa, Prof. Dr. André Luiz dos Santos, Prof. Dr. Leonardo Lataro Paim, Prof. Dr. Rodrigo A. Abarza Munoz e Profa. Dra. Sônia Maria Alves Jorge, pelas contribuições e sugestões que muito enriqueceram este trabalho.

Aos companheiros de laboratório, José Luiz, Acelino, Graziela, Josiel, Edervaldo, Túlio, Luiz Felipe, Victor Hugo e Daniel, pela convivência agradável, momentos de ajuda e descontração. Em especial ao José Luiz, pela amizade, parceria e discussões científicas, ao Acelino pelas viagens até São Paulo e também por sempre se mostrar disposto em me ajudar e ao Marcos Vinicius Foguel pela ajuda com os dados de simulação computacional.

A todos do Departamento de eletroanalítica e NDCOM.

Ao Prof. Paolo Ugo da Ca' Foscari University of Venice pela gentileza e oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa na Itália.

À Profa. Lígia Maria Moretto por sua alegria, carinho, ajuda e aventura nos alpes italianos ao longo do meu estágio de pesquisa.

À Profa. Angela Maria Stortini pelos ensinamentos quanto ao uso do MEV que muito contribuíram na realização deste trabalho.

Aos queridos amigos que fiz na Itália, Maria Sole Salaffi, Najmeh Karimian, Emílio Orsega, Maria Cristina Abrahão, e Stefano Tettamanzi por terem me recebido de braços abertos e tornado meu período em Veneza inesquecível! E também a Shandale e ao André Possan por terem dividido comigo essa incrível experiência. *Grazie mille per tutti!*

Ao Instituto de Química de Araraquara pela oportunidade concedida.

Ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do aparelho de MEV e AFM.

À Capes e ao seu Programa de Doutorado – Sanduíche no exterior – PDSE (processo n ° 88881.135116/2016-01)

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À Ca' Foscari University of Venice por aceitar meu estágio de pesquisa e conceder o suporte para sua realização.

E a todos aqueles que eventualmente não foram aqui mencionados e que colaboraram de alguma maneira para a execução desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“Conheça todas as teorias,  
domine todas as técnicas,  
mas ao tocar uma alma humana,  
seja apenas outra alma humana.”*

*(Carl G. Jung)*

## RESUMO

A vinhaça é um expressivo coproduto da destilação do etanol que apesar de ser considerada poluidora, vem sendo utilizada como fertilizante nas plantações de cana-de-açúcar, colocando em risco a contaminação de aquíferos subterrâneos e salinização do solo. Cerca de 10 a 18 litros de vinhaça são produzidos por litro de etanol destilado e sua constituição é de principalmente sais de potássio, cálcio, magnésio e compostos orgânicos. Dentre estes, os polióis tornam-se importantes compostos por estarem presentes em concentrações altamente significativas e também por apresentar expressiva importância na indústria farmacêutica e alimentícia. Com isso, o conceito de biorrefinarias surge como a possibilidade das usinas terem um pleno aproveitamento deste resíduo, garantindo fins mais lucrativos e ecológicos. Assim, é de grande importância o desenvolvimento de novos métodos para determinação desses compostos, com destaque aos eletroanalíticos, que vem nos últimos anos se destacando por apresentar métodos de análises confiáveis mesmo em baixas concentrações do analito, pequenos volumes de amostra e em matrizes complexas que requerem alta especificidade. Sendo assim, nesse trabalho foi desenvolvido sensores eletroquímicos baseados na técnica de impressão molecular, capaz de produzir polímeros que incorporam as moléculas de interesse em sua estrutura e que são capazes de formar locais específicos de reconhecimento molecular, tornando-se atrativos devido a sua elevada seletividade e estabilidade. Em razão disso, este trabalho tem como objetivo a determinação de polióis utilizando sensores eletroquímicos baseados em polímeros molecularmente impressos (MIP) em eletrodo de carbono vítreo (GCE) contendo óxido de grafeno reduzido (RGO) e nanopartículas de óxido de ouro (AuNP) e de óxido /hidróxido de níquel (NiNP), como também a formação de um conjunto de nanoeletrodos arranjados tridimensionalmente (3DNEE), a fim de aumentar a sensibilidade do sensor impresso devido a existência de uma maior área superficial que está diretamente relacionada com a quantidade de sítios disponíveis para impressão molecular. Os sensores desenvolvidos para determinação de D-manitol (MIP/AuNP/RGO-GCE), mio-inositol (MIP/NiNP/RGO-GCE) e L-arabitol (MIP/3DNEE), foram caracterizados eletroquimicamente por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), quimicamente por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e morfologicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM), mostrando que as modificações foram efetivamente realizadas na superfície do eletrodo. Os resultados foram avaliados utilizando voltametria cíclica (CV) e de pulso diferencial (DPV), em que o hexacianoferrato ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ) e (ferrocenilmetil)trimetilamonio ( $\text{FA}^+$ ) foram utilizados como sonda eletroquímica. O método analítico apresentou baixo limite de detecção,  $7,7 \times 10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup> para D-manitol,  $7,6 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> para mio-inositol e  $7,7 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> para L-arabitol, ampla faixa linear de resposta, boa repetibilidade e estabilidade após longo período de armazenamento. Os sensores foram aplicados com sucesso na determinação dos polióis em amostra de vinhaça de cana-de-açúcar, com reconhecimento seletivo para a molécula alvo mesmo na presença de interferentes. Os ensaios de recuperação mostraram que o método analítico desenvolvido possui boa exatidão, podendo ser considerado adequado para a detecção e quantificação de polióis em vinhaça de cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Óxidos metálicos. Óxido de grafeno reduzido. Impressão molecular. Eletropolimerização. Conjunto de nanoeletrodos. Polióis.

## ABSTRACT

Vinasse is an expressive co-product of ethanol distillation, which despite being considered polluting, has been used as fertilizer in sugarcane plantations, which may put at risk the contamination of groundwater and soil salinization. About 10 to 18 liters of vinasse are produced per liter of distilled ethanol and its composition is mainly of salts of potassium, calcium, magnesium and organic compounds. Among these, polyols become important compounds because they are present in highly concentrations and also due to its importance in the pharmaceutical and food industry. With this, the concept of biorefineries becomes a possibility for the sugar cane plants to take full advantage of this residue, guaranteeing more profitable and ecological ends. Thus, the development of new methods for the determination of these compounds is very important, with emphasis on electroanalytical methods, which recently has been presenting reliable methods of analysis even at low analyte concentrations, small sample volumes and in complex matrices that require high specificity. So, in this work, we developed electrochemical sensors based on the molecular imprinted technique, capable of producing polymers that incorporate the molecules of interest in their structure and that are able to form specific sites of molecular recognition. Therefore, this work reports the development of an electrochemical method for the determination of polyols based on molecularly imprinted polymers (MIP) using gold oxide nanoparticles (AuNP) and nickel oxide/hydroxide (NiNP) anchored on reduced graphene oxide electrodeposited on GCE, as well as the formation of 3D gold nanoelectrode ensembles (3DNEE), in order to increase the sensitivity of the imprinted sensor due to the existence of a larger surface area that is directly related to the amount of available sites for molecular imprinting. Sensors developed for determination of D-mannitol (MIP/AuNP/RGO-GCE), myo-inositol (MIP/NiNP/RGO-GCE) and L-arabitol (MIP/3DNEE) were characterized electrochemically by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), chemically by X-ray spectroscopy (XPS), morphologically by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM), whenever possible, showing that the modifications were effectively performed on the surface of the electrode. The results were evaluated using cyclic voltammetric (CV) and differential pulse (DPV), in which hexacyanoferrate ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ) and (ferrocenylmethyl)trimethylammonium ( $\text{FA}^+$ ) were used as electrochemical probe. The analytical method presented low limit of detection,  $7.7 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$  for D-mannitol,  $7.6 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$  for mio-inositol and  $7.7 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  for L-arabitol, wide linear range of response, good repeatability and stability after long storage period. The sensors were successfully applied in the determination of the polyols in sample of sugarcane vinasse, with selective recognition for the target molecule even in the presence of interferers. The recovery tests showed that the analytical method developed has good accuracy and can be considered suitable for the detection and quantification of polyols in sugarcane vinasse.

**Keywords:** Metal oxides. Reduced graphene oxide. Molecular imprinting. Electropolymerization. 3D gold nanoelectrode ensembles. Polyalcohol

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura do D-manitol. ....	29
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do mio-inositol. ....	30
<b>Figura 3</b> - Estrutura do L-arabitol.....	31
<b>Figura 4</b> - Esquema da obtenção do óxido de grafeno reduzido a partir do grafite. ....	36
<b>Figura 5</b> - Esquema para a formação do MIP e métodos eletroquímicos de transdução do sinal. ....	39
<b>Figura 6</b> - (a) Membrana de PC, (b) processo de crescimento dos nanofios de ouro nos poros da membrana e (c) remoção da camada superficial de ouro.....	48
<b>Figura 7</b> - Esquema do preparo do NEE usando uma membrana de policarbonato. (A) Uma parte da membrana de PC contendo os nanoeletrodos; (B) vista superior; (C) NEE para uso como eletrodo de trabalho. (a) Membrana contendo nanoeletrodos, (b) fita adesiva de cobre para conectar à instrumentação, (c) fita adesiva de alumínio, (d) fita isolante com filamentos de vidro. Adaptado de Ongaro et al, [85] .....	49
<b>Figura 8</b> - Dissolução parcial da membrana de PC para formação do 3DNEE.....	50
<b>Figura 9</b> - Voltamograma cíclico para GCE em (a) 0,10 mol L <sup>-1</sup> de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e (b) 0,50 mg mL <sup>-1</sup> de GO em meio de 0,10 mol L <sup>-1</sup> de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	54
<b>Figura 10</b> - Voltamogramas cíclicos de 0,10 mol L <sup>-1</sup> de KCl contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> em (a) carbono vitreo e contendo (b) 0,25 (c) 0,50 e (d) 0,75 mg mL <sup>-1</sup> de GO eletrodepositado, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	55

<b>Figura 11</b> - Variação da corrente anódica para a oxidação de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em diferentes tempos de eletrodeposição, contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em diferentes tempos de eletrodeposição. ....	56
<b>Figura 12</b> - Voltamogramas cíclicos referente a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de D-manitol em meio de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para (a) AuNP/RGO-GCE e para (b) RGO-GCE, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	59
<b>Figura 13</b> - Parâmetros avaliados na formação de nanopartículas de ouro sobre a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de D-manitol em meio de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, sendo: (A) Efeito da concentração de $\text{AuCl}_4^-$ , (B) Efeito do potencial e (C) tempo de eletrodeposição.....	60
<b>Figura 14</b> - Sucessivos voltamogramas cíclicos do eletrodo AuNP/RGO-GCE em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	62
<b>Figura 15</b> - CV para (a) GCE, (b) RGO-GCE, (c) AuNP/RGO-GCE em solução contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	63
<b>Figura 16</b> - Eletropolimerização de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de <i>o</i> -fenilenodiamina em eletrodo de AuNP/RGO-GCE em solução tampão acetato pH 4,8 contendo $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de D-manitol, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .....	64
<b>Figura 17</b> - Mecanismo da eletropolimerização da <i>o</i> -PD.....	64
<b>Figura 18</b> - Representação da impressão de D-manitol em <i>o</i> -PD no eletrodo de AuNP/RGO-GCE. ....	66
<b>Figura 19</b> - CV para (a) MIP (b) NIP (c) MIP após remoção da molécula de D-manitol e (d) MIP após a ligação de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de D-manitol, em solução contendo $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .....	67

<b>Figura 20</b> - Efeito da concentração de o-PD, durante a eletropolimerização com (MIP) e sem D-manitol (NIP), na resposta do sensor usando DPV na presença de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> em 0,10 mol L <sup>-1</sup> KCl.....	68
<b>Figura 21</b> - Efeito da concentração de D-manitol durante a eletropolimerização com o-PD. A resposta do MIP foi avaliada em DPV na presença de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> em 0,10 mol L <sup>-1</sup> KCl.....	69
<b>Figura 22</b> - Influência do número de ciclos durante a eletropolimerização de o-PD na presença (MIP) e na ausência (NIP) de D-manitol. A variação da resposta foi analisada por DPV na presença de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> em 0,10 mol L <sup>-1</sup> KCl .....	70
<b>Figura 23</b> - Influência do pH na eletropolimerização de o-PD na presença (MIP) e na ausência (NIP) de D-manitol. Variação da resposta foi realizada por DPV na presença de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> em 0,10 mol L <sup>-1</sup> KCl. ....	71
<b>Figura 24</b> - Efeito do tempo de extração na corrente de pico da resposta voltametria na presença de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> em 0,10 mol L <sup>-1</sup> KCl. ....	73
<b>Figura 25</b> - Efeito do tempo de religação na resposta do MIP através da resposta voltametria na presença de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> em 0,10 mol L <sup>-1</sup> KCl. ....	74
<b>Figura 26</b> - Diagrama de Nyquist para diferentes eletrodos (a) GCE (b) RGO-GCE (c) AuNP/RGO-GCE (d) MIP/AuNP/RGO-GCE antes da extração de D-manitol (e) MIP/AuNP/RGO-GCE após religação de D-manitol (f) MIP/AuNP/RGO-GCE após a extração de D-manitol. Solução para análise de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> em 0,10 mol L <sup>-1</sup> KCl e a faixa de frequência foi de 0,01 Hz a 100 kHz. ....	75
<b>Figura 27</b> - Espectro de XPS para C 1s , O 1s, Au4F e N1s .....	76
<b>Figura 28</b> - Amplo espectro de XPS para (A) AuNP/RGO-GCE e (B) MIP/AuNP-RGO-GCE. ....	77

<b>Figura 29</b> – Imagens de AFM para (A) eletrodo AuNP/RGO-GCE, (B) MIP antes da remoção de D-manitol, (C) MIP após a remoção do modelo e (D) NIP.....	79
<b>Figura 30</b> - Imagens de MEV para (A) GCE, (B) RGO-GCE, (C) AuNP/RGO-GCE, (D) MIP/AuNP/RGO-GCE antes da remoção de D-manitol (E) MIP/AuNP/RGO-GCE após remoção do D-manitol (F) Espectro de EDX para AuNP/RGO-GCE. ....	80
<b>Figura 31</b> - Curva de calibração para a detecção de D-manitol usando MIP/AuNP/RGO-GCE em $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ após 15 min de religação em PBS pH 6,5. A curva apresentada na inserção superior esquerda foi obtida com a concentração de D-manitol na faixa de $1,0 \times 10^{-12}$ a $2,0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ . Os voltamogramas de DPV correspondentes com a concentração de D-manitol na faixa de $1,0 \times 10^{-12}$ a $3,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ estão na inserção inferior esquerda.....	82
<b>Figura 32</b> - Resposta do sensor MIP/AuNP/RGO-GCE e NIP/AuNP/RGO-GCE em $5,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ de D-manitol, L-arabitol, Mio-inositol, glicerol, frutose e glicose em meio de PBS pH 6,5, após incubação de 15 min.....	85
<b>Figura 33</b> - Resposta do eletrodo na oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de mio-inositol em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH por DPV, em diferentes cargas aplicadas na eletrodeposição de nanopartículas de níquel em RGO-GCE.....	89
<b>Figura 34</b> - Resposta do eletrodo na oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de mio-inositol em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH por DPV, em diferentes potenciais para a eletrodeposição de nanopartículas de níquel em RGO-GCE.....	90
<b>Figura 35</b> - Sucessivos Voltamogramas cíclicos de NiNP/RGO-GCE em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, no intervalo de potencial de 0,10 a 0,70 V a $50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	91
<b>Figura 36</b> - Voltamograma cíclico para $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de mio-inositol em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em (a) GCE (b) RGO-GCE e (c) NiNP/RGO-GCE.....	92

<b>Figura 37</b> - Voltamograma cíclico para a eletropolimerização de $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol em $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ , contendo $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de mio-inositol em NiNP/RGO-GCE, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .	93
<b>Figura 38</b> - Processo de polimerização do pirrol.	94
<b>Figura 39</b> - Interação das unidades de PPy com a molécula de mio-inositol durante o processo de eletropolimerização.	94
<b>Figura 40</b> - Reação de superoxidação do polipirrol.	95
<b>Figura 41</b> - Voltamograma cíclico da superoxidação do filme de PPy em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH para MIP e NIP, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .	96
<b>Figura 42</b> - Voltamogramas cíclicos de (a) MIP/NiNP/RGO-GCE após eletropolimerização (b) GCE, (c) MIP/NiNP/RGO-GCE após 20 minutos de religação em solução de mio-inositol $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (d) MIP/NiNP/RGO-GCE após remoção de mio-inositol (e) NiNP/RGO-GCE. Todas as medidas foram realizadas em solução contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fe (CN)}_6^{3-/4-}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .	97
<b>Figura 43</b> - Efeito da concentração de pirrol durante a eletropolimerização com (MIP) e sem (NIP) mio-inositol, em DPV na presença de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl.	99
<b>Figura 44</b> - Efeito da concentração de mio-inositol durante a eletropolimerização com pirrol na resposta do MIP em DPV na presença de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl.	100
<b>Figura 45</b> - Influência do número de ciclos durante a eletropolimerização de pirrol na presença (MIP) e na ausência (NIP) de mio-inositol. A variação da resposta foi analisada por DPV na presença de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl.	101

<b>Figura 46</b> - Influência do número de ciclos durante a superoxidação de pirrol para remoção da molécula de mio-inositol. A variação da resposta foi analisada por DPV na presença de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. ....	102
<b>Figura 47</b> – Efeito do tempo de religação da molécula de mio-inositol na variação da resposta em DPV na presença de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl.....	103
<b>Figura 48</b> - Influência do pH na religação da molécula de mio-inositol. Resultados avaliados na variação da resposta em DPV na presença de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl.....	104
<b>Figura 49</b> - Imagens de MEV para (A) e (B) NiNP/RGO-GCE, (C) MIP/NiNP/RGO-GCE e (D) MIP/NiNP/RGO-GCE após superoxidação do PPy.....	105
<b>Figura 50</b> - Imagens de AFM para (A) NiNP/RGO-GCE, (B) MIP antes e em (C) MIP após a remoção da molécula de mio-inositol, (D) NIP.....	106
<b>Figura 51</b> - Espectro de XPS para C1s (A) , O1s (B) e N1s (C) após a eletropolimerização e C1s (D) e O1s(E) depois da superoxidação do PPy. ....	108
<b>Figura 52</b> - Curva de calibração para a detecção de mio-inositol usando MIP/NiNP/RGO-GCE em $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ após 20 minutos de religação em PBS pH 6.0 contendo $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de mio-inositol. Os voltamogramas de DPV correspondente as concentrações de mio-inositol adicionadas estão na inserção inferior esquerda. ....	110
<b>Figura 53</b> - Seletividade do MIP/NiNP/RGO-GCE para $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de mio-inositol e possíveis interferentes.....	113
<b>Figura 54</b> - Processo electroless usado para a deposição de ouro nos poros da membrana de policarbonato. ....	117

<b>Figura 55-</b> Voltamogramas cíclicos para diferentes sondas redox em NEE. Sendo (a) FA <sup>+</sup> (b) FcCOOH, (c) Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-4-</sup> na concentração de 1.0×10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> em 5.0×10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> KNO <sub>3</sub> , $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	119
<b>Figura 56</b> - Voltamograma cíclico para FA <sup>+</sup> na concentração de 1.0×10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> em 5.0×10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> KNO <sub>3</sub> , em (a) NEE e (b) 3DNEE, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . .....	120
<b>Figura 57</b> - Voltamogramas cíclicos dos dois primeiros ciclos da eletropolimerização de o-PD em 3DNEE com tempos de etching de 2 s, 10 s e 30 s, em solução contendo 2,0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> de o-PD e 1,0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> de L-arabitol em meio de tampão acetato pH 4,8, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . .....	122
<b>Figura 58</b> -Variação da corrente em diferentes concentrações de L-arabitol para MIP/3DNEE, com 3DNEE feito em 2, 10 e 30 s de etching.....	124
<b>Figura 59</b> – Voltamogramas cíclicos para (a) 3DNEE (b) MIP/3DNEE após a remoção do modelo, (c) MIP/3DNEE após 30 minutos de religação em 5,0 x 10 <sup>-8</sup> mol L <sup>-1</sup> de L-arabitol (d) 3DNEE após a eletropolimerização. Todas as medições foram realizadas em solução contendo 1,0 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> de FA <sup>+</sup> em 5,0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> KNO <sub>3</sub> , $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	125
<b>Figura 60</b> - Efeito da concentração de L-arabitol durante a eletropolimerização com o-PD na resposta do MIP/3DNEE na presença de 1,0 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> de FA <sup>+</sup> em 5,0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> KNO <sub>3</sub> . .....	126
<b>Figura 61</b> - Influência do número de ciclos durante a eletropolimerização de o-PD com L-arabitol. A variação da resposta foi analisada por DPV na presença de 1,0 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> de FA <sup>+</sup> em 5,0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> KNO <sub>3</sub> . .....	127
<b>Figura 62</b> - Efeito do tempo de extração na resposta do MIP/3DNEE e NIP/3DNEE por DPV na presença de 1,0 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> de FA <sup>+</sup> em 5,0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> KNO <sub>3</sub> . .....	129

<b>Figura 63</b> - Efeito do tempo de religação da molécula de L-arabitol na resposta do sensor MIP/3DNEE por DPV na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> de FA <sup>+</sup> em $5,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> KNO <sub>3</sub> . .....	130
<b>Figura 64</b> - Imagens de MEV para (A) e (B) NEE, (C) 3DNEE, (D) tamanho de um nanofio para 3DNEE, (E) MIP/3DNEE e (F) análise de EDS.....	131
<b>Figura 65</b> - Diagrama de Nyquist para 2DNEE (curva b), 3DNEE (curva a), MIP/3DNEE (curva e) e MIP/3DNEE antes (curva c) e após (curva d) religação das moléculas de L-arabitol. Na inserção superior direta está o circuito equivalente. ....	132
<b>Figura 66</b> - Curva logarítmica de ΔI pela concentração de L-arabitol e inserção da isoterma de adsorção de Langmuir para MIP/3DNEE.....	134
<b>Figura 67</b> - Resposta do MIP/3DNEE em DPV em diferentes concentrações de L-arabitol ( $1,0 \times 10^{-9}$ - $1,5 \times 10^{-7}$ mol L <sup>-1</sup> ), utilizando como sonda redox uma solução de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> de FA <sup>+</sup> preparado em $5,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de KNO <sub>3</sub> .....	135
<b>Figura 68</b> – Análise da seletividade do MIP/3DNEE para diferentes concentrações de L-arabitol, glicose, D-manitol e frutose.....	136

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição química da vinhaça em Kg/m <sup>3</sup> .....	28
<b>Tabela 2</b> - Parâmetros voltamétricos na oxi-redução de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> em GCE e RGO-GCE. 57	
<b>Tabela 3</b> - Comparação da faixa linear e LD para alguns métodos reportados para determinação eletroquímica de D-manitol.....	83
<b>Tabela 4</b> - Estudo da estabilidade do MIP/AuNP/RGO-GCE.....	83
<b>Tabela 5</b> - Seletividade do sensor MIP/AuNP/RGO-GCE para 5,0×10 <sup>-8</sup> mol L <sup>-1</sup> de D-manitol e possíveis interferentes.....	86
<b>Tabela 6</b> - Determinação de D-manitol em amostras de vinhaça de cana (n = 3).....	87
<b>Tabela 7</b> - Comparação da faixa linear e limite de detecção de alguns métodos reportados na literatura para a determinação de mio-inositol. ....	111
<b>Tabela 8</b> - Estudo da estabilidade do MIP/NiNP/RGO-GCE.....	112
<b>Tabela 9</b> - Fator de impressão e fator de seletividade do sensor MIP/NiNP/RGO-GCE para 1,0 × 10 <sup>-8</sup> mol L <sup>-1</sup> de mio-inositol e possíveis interferentes.....	113
<b>Tabela 10</b> - Determinação de mio-inositol em vinhaça de cana-de-açúcar (n=3).....	115
<b>Tabela 11</b> - Comparação entre a corrente faradaica e capacitiva do NEE e 3DNEE. ....	120
<b>Tabela 12</b> - Fator de impressão (α) e fator de seletividade (β) para MIP/3DNEE na presença de moléculas interferentes.....	137
<b>Tabela 13</b> - Estabilidade do MIP/3DNEE .....	137
<b>Tabela 14</b> - Determinação de L-arabitol em vinhaça de cana-de-açúcar (n=3).....	138

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>1.1 VINHAÇA DE CANA DE AÇÚCAR.....</b>	<b>27</b>
<b>1.2 POLIÓIS.....</b>	<b>28</b>
1.2.1 D-Manitol .....	29
1.2.2 Mio-inositol .....	29
1.2.3 L-Arabitól .....	30
<b>1.3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE POLIÓIS.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4 SENSORES ELETROQUÍMICOS.....</b>	<b>32</b>
1.4.2 Nanopartículas metálicas .....	33
1.4.3 Nanofios metálicos .....	34
1.4.4 Óxido de grafeno reduzido .....	35
1.4.5 Polímeros molecularmente impressos .....	38
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 EQUIPAMENTOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3 LIMPEZA DO GCE .....</b>	<b>45</b>
<b>3.4 MODIFICAÇÃO DO GCE COM RGO .....</b>	<b>45</b>
<b>3.5 PREPARAÇÃO DO AUNP/RGO-GCE.....</b>	<b>45</b>
<b>3.6 FORMAÇÃO DO MIP SOBRE O AUNP/RGO-GCE PARA DETERMINAÇÃO DE D-MANITOL</b> <b>.....</b>	<b>46</b>
<b>3.7 PREPARAÇÃO DO NiNP/RGO-GCE.....</b>	<b>46</b>
<b>3.8 FORMAÇÃO DO MIP SOBRE NiNP/RGO-GCE PARA DETERMINAÇÃO DE MIO-INOSITOL</b> <b>.....</b>	<b>46</b>
<b>3.9 PREPARAÇÃO DO 3DNEE.....</b>	<b>47</b>
<b>3.10 FORMAÇÃO DO MIP SOBRE 3DNEE PARA DETERMINAÇÃO DE L-ARABITOL .....</b>	<b>50</b>
<b>3.11 MEDIDAS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>50</b>
<b>3.12 DETERMINAÇÃO DOS POLIÓIS EM AMOSTRAS DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR. ....</b>	<b>51</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 REDUÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2 FORMAÇÃO DO MIP/AUNP/RGO-GCE PARA DETERMINAÇÃO DE D-MANITOL .....</b>	<b>58</b>

4.2.1 Eletrodeposição de AuNP em RGO-GCE .....	58
4.2.2 Eletropolimerização de o-PD em AuNP/RGO-GCE para detecção de D-manitol .....	63
4.2.3 Estudo dos parâmetros que influenciam a formação do MIP/AuNP/RGO-GCE.....	67
4.2.3.1 Efeito da concentração de o-fenilenodiamina.....	68
4.2.3.2 Efeito da concentração de D-manitol.....	69
4.2.3.3 Efeito do número de ciclos na eletropolimerização .....	70
4.2.3.4 Influência da concentração hidrogeniônica.....	71
4.2.3.5 Efeito do tempo de extração da molécula de D-manitol .....	72
4.2.3.6 Influência do tempo de religação da molécula .....	73
4.2.4 Caracterização do MIP/AuNP/RGP-GCE .....	74
4.2.6 Seletividade do MIP/AuNP/RGO-GCE para D-manitol .....	84
4.2.7 Determinação da D-manitol em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar .....	86
<b>4.3 FORMAÇÃO DO MIP/NiNP/RGO-GCE PARA DETERMINAÇÃO DE MIO-INOSITOL .....</b>	<b>88</b>
4.3.1 Eletrodeposição de NiNP em RGO-GCE .....	88
4.3.2 Eletropolimerização de pirrol em NiNP/RGO-GCE para detecção de mio-inositol .....	92
4.3.3 Estudo dos parâmetros que influenciam a formação do MIP/NiNP/RGO-GCE.....	98
4.3.3.1 Efeito da concentração de pirrol.....	98
4.3.3.2 Efeito da concentração de mio-inositol.....	99
4.3.3.3 Efeito do número de ciclos na eletropolimerização .....	100
4.3.3.4 Efeito do número de ciclos para remoção de mio-inositol.....	101
4.3.3.5 Influência do tempo na religação da molécula nas cavidades do MIP.....	102
4.3.3.6 Influência do pH na religação da molécula de mio-inositol.....	103
4.3.4 Caracterização do MIP/NiNP/RGP-GCE .....	104
4.3.5 Desempenho analítico do MIP/NiNP/RGO-GCE .....	109
4.3.6 Seletividade do MIP/NiNP/RGO-GCE .....	112
4.3.7 Determinação da mio-inositol em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar .....	114
<b>4.4 FORMAÇÃO DO MIP/3DNEE PARA DETERMINAÇÃO DE L-ARABITOL.....</b>	<b>116</b>
4.4.1 Construção do NEE .....	116
4.4.2 Comportamento eletroquímico do NEE .....	118
4.4.3 Formação do 3DNEE.....	119
4.4.4 Formação do MIP/3DNEE .....	121
4.4.5 Resposta do sensor em eletrodos com diferentes tempos de gravação.....	123
4.4.6 Comportamento eletroquímico do MIP/3DNEE .....	124

4.4.7 Estudo dos parâmetros que influenciam a formação do MIP/3DNEE .....	125
4.4.7.1 Efeito da concentração da molécula de L-arabitol.....	126
4.4.7.2 Efeito do número de ciclos .....	127
4.4.7.3 Efeito do tempo de extração do L-arabitol na formação das cavidades.....	128
4.4.7.4 Efeito do tempo na religação da molécula de L-arabitol.....	129
4.4.8 Caracterização do NEE, 3DNEE e MIP/3DNEE .....	130
4.4.9 Estudo da isoterma de ligação .....	133
4.4.10 Desempenho analítico.....	134
4.4.11 Seletividade, reprodutibilidade e estabilidade do MIP/3DNEE .....	135
4.4.12 Aplicação do MIP/3DNEE em amostra real.....	138
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>139</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>141</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Vinhaça de cana de açúcar

A vinhaça é um coproduto da agroindústria sucroalcooleira, obtida na etapa de destilação do etanol. Apresenta-se na forma de solução escura, com baixo valor de pH e de forte odor. Na sua composição pode-se encontrar de 2 % a 8 % de sólidos dissolvidos, dos quais, 70 % são de matéria orgânica. Essa alta porcentagem de matéria orgânica faz da vinhaça um resíduo altamente poluidor. A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) pode atingir valores ao redor de 20.000 mg/L, cerca de cem vezes maior que a do esgoto doméstico (1).

O destino mais comum para a vinhaça é a sua utilização na própria plantação de cana-de-açúcar como fertilizante, devido a sua composição mineral de cerca de 30 % de potássio, além de nitrogênio e fósforo (Tabela 1) (2). No entanto, o uso da vinhaça no solo não está sujeita ao controle ambiental apropriado, podendo causar contaminação do lençol freático, salinização do solo, lixiviação de metais e sulfatos, liberação de mau cheiro e emissão de gases causadores do efeito estufa, como o óxido nitroso ( $N_2O$ ), que é cerca de 300 vezes mais poluente que o dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (3).

A produção de vinhaça pode variar de 10 a 18 litros por litro de etanol destilado (4). A produção estimada de etanol no Brasil para a safra de 2017/2018 é de aproximadamente 26,4 bilhões de litros. Em 2015, a produção de etanol foi recorde, atingindo os 30 bilhões de litros (5). Isso significa que a produção de vinhaça no país pode atingir cerca de 330 bilhões de litro por safra.

Neste contexto, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para encontrar usos e tratamentos alternativos para a vinhaça, a fim de contornar o impacto ambiental e melhorar a viabilidade econômica e a sustentabilidade da produção através da cogeração de outros produtos além de etanol e açúcar.

Alguns dos destinos alternativos para a vinhaça são a digestão anaeróbica e aeróbica (3, 6, 7) para a produção de energia (biogás), produção de alimentos para gado (8) e reutilização em processos de fermentação (9). Outro destino alternativo é a utilização das substâncias químicas presentes em sua composição, por recuperação dentro de instalações de biorrefinarias, que possibilita a recuperação dos compostos presentes em sua constituição em produtos químicos ou biocombustível, proporcionando um melhor aproveitamento da biomassa.

A fração de matéria orgânica da vinhaça é composta basicamente de álcoois, açúcares, derivados de açúcar, fenóis e ácidos orgânicos (10, 11). Em particular, os derivados de açúcar estão presentes na vinhaça em grandes quantidades porque eles são os principais produtos da fermentação do açúcar. Entre esses derivados estão os polióis, também conhecidos como poliálcoois ou álcoois de açúcar, que podem ser recuperados e reutilizados pela indústria por meio de uma biorrefinaria.

**Tabela 1** - Composição química da vinhaça em Kg/m<sup>3</sup>.

<b>Composição</b>	<b>Concentração</b>
Carbono	19,2
Nitrogênio	1,2
Fosforo	0,2
Potássio	7,8
Cálcio	3,5
Magnésio	1,0
Sulfato	6,4
Matéria orgânica	63,4

Fonte: adaptado de Silva, et al. (2).

## 1.2 Polióis

A composição química da vinhaça de cana-de-açúcar pode sofrer variações dependendo da variedade e da qualidade da cana-de-açúcar, da época da colheita e do processo de destilação utilizado. Apesar disso, as concentrações de polióis encontrados na vinhaça são muito significativas, alcançando valores de até 0.115g L<sup>-1</sup> (10, 12) . Os principais polióis encontrados na vinhaça são: D-manitol, mio-inositol, L-arabitol e eritritol, sendo este último menos expressivo.

De modo geral, esses compostos possuem características interessantes, como propriedades adoçantes, tamponantes, conservantes e antioxidantes, que permitem várias aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (13–15). Além disso, produtos extraídos a partir de matérias primas renováveis são mais seguros e efetivos biologicamente para a alimentação humana e animal do que produtos sintetizados (16). Assim, o desenvolvimento de rotas

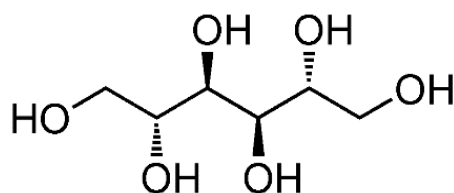
tecnológicas capazes de aproveitar a biomassa e obter produtos químicos de médio e alto valor agregado, vem se tornando um atrativo econômico, estratégico e ecológico.

As características de cada um dos polióis encontrados na vinhaça de cana-de-açúcar, que serão o foco dessa tese, serão descritas nas próximas seções.

### 1.2.1 D-Manitol

O D-manitol ou hexan-1,2,3,4,5,6-hexol (Figura 1), é um poliol acíclico, considerado um importante edulcorante de baixo valor calórico, uma vez que é absorvido apenas parcialmente pelo intestino delgado. Isso o torna muito atraente do ponto de vista da indústria alimentícia. Além disso, o D-manitol tem ampla gama de aplicação na indústria farmacêutica, atuando como facilitador no transporte de medicamentos e excipientes em comprimidos (especialmente aqueles destinados a se dissolverem na boca, devido à agradável sensação de doçura e frescor). Devido sua propriedade não higroscópica, é utilizado em comprimidos contendo compostos sensíveis à umidade, tais como ácido acetilsalicílico e vitamina C. Atua também no controle osmótico (diurético), redução da pressão intracraniana pós-cirurgia (17), anestésico (15) e também na síntese de medicamentos, como por exemplo, do Tamiflu (18).

**Figura 1** - Estrutura do D-manitol.



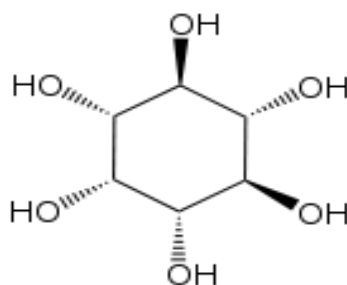
Fonte: elaborado pelo autor.

### 1.2.2 Mio-inositol

O mio-inositol ou cis-1,2,3,5-trans-4,6-ciclohexanahexol (Figura 2), é um poliálcool cíclico e o mais prevalente entre os estereoisômeros do inositol. É amplamente distribuído na natureza e facilmente encontrado em animais, plantas, sementes, fungos e algumas bactérias [1]. Avanços recentes mostraram que a molécula oferece benefícios essenciais para a saúde humana, auxiliando no tratamento e prevenção de diversas doenças. O mio-inositol demonstrou

ser um eficiente agente antidepressivo, atuando nos distúrbios associadas à ansiedade, como distúrbios de pânico e compulsão alimentar (19, 20). Demonstrou ser um eficaz inibidor do desenvolvimento de tumores pulmonares em roedores atuando como agente quimiopreventivo (21, 22). Apresentou bons resultados como suplemento dietético para o aumento da fertilidade feminina, sendo considerado um bom agente no tratamento da síndrome de ovário policístico (23). Além disso, pesquisas demonstraram que o nível de mio-inositol no sangue pode auxiliar no monitoramento do tratamento de doenças cardiovasculares (24), Alzheimer (25), diabetes e doenças renais (26).

**Figura 2** - Estrutura química do mio-inositol.

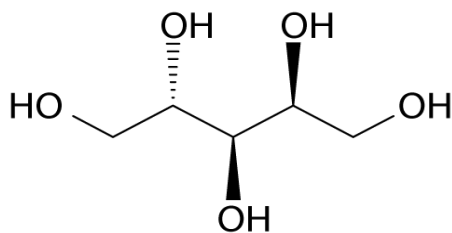


Fonte: elaborado pelo autor.

### 1.2.3 L-Arabitól

L-arabitol, L-arabinitol ou (2S,4S)-pentano-1,2,3,4,5-pentol (Figura 3), é um poliálcool obtido a partir da redução da arabinose. Este álcool de açúcar, cristalino e incolor, tem uma doçura semelhante à sacarose, mas com baixas calorias devido à baixa absorção pelo trato digestivo humano e portanto, pode ser usado na prevenção de depósitos de gordura no trato digestivo. Além disso, não favorece o crescimento bacteriano, o que significa que seu consumo, ao contrário dos açúcares, não leva formação de cáries (27, 28). Também é comumente utilizado como excipientes em formulações para comprimidos e em processos de liofilização(29). Assim, o L-arabitol é muito utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica.

**Figura 3** - Estrutura do L-arabitol.



Fonte: elaborado pelo autor.

### 1.3 Métodos de determinação de polióis

Devido a sua estrutura poli-hídrica de fácil oxidação, muitos métodos para quantificação de polióis encontrados na literatura são baseados nos métodos de análise de açúcares (26). Entre esses, os mais amplamente utilizados são os métodos cromatográficos, tais como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (30), cromatografia líquida de alta eficiência (31), cromatografia gasosa (32) e cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada (33, 34).

Embora esses métodos tradicionais de análise sejam precisos e bem estabelecidos, eles envolvem procedimentos laboriosos de pré-concentração, necessidade de grandes quantidades de reagentes (muitas vezes orgânicos e de elevada toxicidade), instrumentos de alto custo e tempo consideravelmente longo de análise. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos eficientes para a determinação de polióis que sejam seletivos, rápidos e sensíveis.

Os métodos eletroquímicos têm como principais vantagens a simplicidade rapidez de análise, alta sensibilidade e estabilidade, além de apresentarem possibilidade de análise direta na amostra (sem necessidade de pré-tratamento) e miniaturização dos dispositivos, tornando o método muito interessante para realizar medidas em campo e em tempo real.

## 1.4 Sensores eletroquímicos

Sensores eletroquímicos são dispositivos capazes de fornecer informações do ambiente em que estão inseridos com mínima manipulação do sistema. As principais características desses dispositivos são a precisão, sensibilidade, capacidade de operar em matrizes complexas e estabilidade. Além disso, podem ser portáteis, de fácil automação e miniaturização.

Basicamente, existem três tipos de transdução de sinal em sensores eletroquímicos, eles podem ser potenciométricos, amperométricos e condutométricos. Nos sensores potenciométricos, um equilíbrio é estabelecido na interface do sensor e as informações analíticas são obtidas na forma de potencial (normalmente diferença de potencial entre dois eletrodos) que é proporcional à atividade das espécies envolvidas. Os sensores amperométricos são baseados na geração de corrente em resposta ao comportamento redox do analito na superfície do eletrodo e as medidas são feitas registrando o fluxo de corrente na célula eletroquímica em um determinado potencial. A característica operacional desses dispositivos é a transferência de elétrons para ou a partir do analito. Os sensores condutométricos dependem das mudanças de condutividade elétrica influenciada pelo analito presente. As informações são adquiridas a partir da variação das concentrações de espécies iônicas, sendo a medida da condutância ou resistência elétrica os parâmetros essenciais (35).

Apesar da versatilidade dos sensores eletroquímicos, algumas limitações podem resultar em um baixo desempenho analítico. A passivação gradual da superfície, elevada corrente de fundo e falta de seletividade, uma vez que a maioria dos sensores operam no modo amperométrico, podendo existir espécies químicas que também são eletroativas no potencial selecionado (36).

Assim, uma estratégia para contornar os problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos é o uso de eletrodos modificados. O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido por Murray et al (37) em 1975 para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, imobilizadas em suas superfícies. Esses eletrodos são capazes de diminuir o envenenamento da superfície, apresentar maior seletividade, sensibilidade e atividade eletrocatalítica quando comparados aos eletrodos sólidos não modificados como de carbono, ouro e platina (38). Os EQM apresentam um aumento efetivo da área eletroativa do eletrodo, uma vez que os modificadores apresentam uma estrutura tridimensional, o que permite que as espécies de interesse alcancem facilmente os centros catalíticos, facilitando a transferência de carga.

Para suportar o modificador, a escolha do eletrodo base é um aspecto muito importante de preparação do EQM. O substrato deve ser fácil de modificar e apresentar uma superfície reprodutível e limpa (39). Um dos substratos que vem sendo muito utilizado em eletroanalítica é o eletrodo de carbono vítreo, GCE (do inglês – *glassy carbon electrode*), pois apresenta baixa resistência elétrica, alta resistência química e ampla janela de potencial (40).

Entre os modificadores, os mais utilizados para construção de sensores eletroquímicos, são os materiais nanoestruturados, tais como nanopartículas de metais nobres e nanopartículas de óxido metálicos, nanofios metálicos (41, 42), grafeno, óxidos de grafeno e nanotubos de carbono (43, 44). Outros materiais incluem enzimas (45) e polímeros molecularmente impressos (46).

#### 1.4.2 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas vem se destacando em eletroanálise devido as suas propriedades físicas e químicas não usuais. Dependendo do seu tamanho e formato, as nanopartículas (NP) apresentam elevada atividade catalítica, facilitam a transferência de elétrons, possuem elevada área superficial, controle sobre o microambiente local e melhoram a relação sinal/ruído. Além disso, a facilidade na miniaturização dos substratos contendo nanomateriais torna estes dispositivos muito atraentes para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, além de contribuir no aumento da resposta eletroquímica do analito (47).

As nanopartículas de prata, ouro, platina, paládio, rutênio, cobre e níquel são as mais estudadas para aplicações em eletroanalítica (48). Em especial, as nanopartículas de ouro (AuNP) e nanopartículas de níquel (NiNP), têm sido intensamente investigadas na modificação de eletrodos devido à baixa toxicidade, excelentes atividades catalíticas para a oxidação de uma grande variedade de compostos orgânicos e elevada relação área/volume.

As características físico-químicas das AuNP incluem, eficiência na condução de energia elétrica, propriedades ópticas (49–53), excelência em biocompatibilidade e imobilização de biomoléculas, o que fez crescer seu uso em biossensores, sensores de DNA e imunossensores (53). Além disso, a oxidação de moléculas orgânicas como álcoois (54), ácidos orgânicos e carboidratos, como a glicose (55), é favorecida na superfície dessas nanopartículas quando em solução alcalina, devido a formação do hidróxido de ouro cataliticamente ativo (56).

As NiNP são caracterizadas por serem de baixo custo e apresentar atividade catalítica para moléculas orgânicas, como na oxidação de carboidratos (57). O níquel, por ser um metal não nobre, pode formar facilmente em sua superfície o hidróxido de níquel e assim uma reação

catalítica é estabelecida envolvendo espécie de níquel de alta valência e a molécula orgânica, como por exemplo na eletrooxidação de açúcares em que o par redox  $\text{Ni}^{2+} / \text{Ni}^{3+}$  está presente na forma de  $\text{NiOH}$  e  $\text{NiOOH}$  (35).

#### 1.4.3 Nanofios metálicos

Os nanofios, nos quais podem ser organizados para obtenção do chamado conjunto de nanoeletrodos (NEE), são conhecidos por serem excelentes dispositivos eletroquímicos, que quando arranjados tridimensionalmente (3DNEE) elevam a área ativa disponível (58). Os 3D-NEEs oferecem numerosas vantagens sobre os macroeletrodos convencionais, tais como melhor transporte de massa, redução da resistência da solução, eletrocatalise, baixo limite de detecção e melhor relação sinal-ruído (59, 60).

Os 3DNEEs são caracterizados por apresentarem maior sensibilidade e limites de detecção cerca de 2-3 ordens de magnitude menor do que os macroeletrodos com a mesma área geométrica (61). Dentre os trabalhos publicados que fazem uso desses nanoeletrodos metálicos, podemos citar a determinação de nitrito (62), arsênico (63), epinefrina (64) e proteínas (59), com limites de detecção na faixa de nanomolar.

A maior parte destes estudos desenvolveu os 3DNEEs por deposição química de metais no interior dos poros de uma membrana de policarbonato (PC), sendo também possível utilizar a técnica da eletrodeposição (62). Essas membranas de PC possuem poros de cerca de 30 -100 nm de diâmetro e comprimento entre 0,1 - 40  $\mu\text{m}$ . Através destes poros os nanofios metálicos crescem, dando origem ao conjunto de filamentos metálicos que se comportam como pequenos eletrodos isolados, formando um conjunto de nanoeletrodos. Após a remoção parcial da membrana de PC, os nanofios são expostos, formando um conjunto de nanoeletrodos tridimensionais, aumentando assim, a área superficial do eletrodo.

Entre os diferentes metais utilizados na construção dos 3DNEEs, o ouro apresenta vantagens frente a outros metais, graças as suas propriedades peculiares. Por ser um metal nobre, o ouro é quimicamente inerte, o que o torna interessante para muitas aplicações eletroquímicas. Muitos exemplos de aplicações de nanomateriais a base de ouro, desde estruturas simples até as mais sofisticadas, entre eles os 3DNEEs, são descritos na literatura (63, 65, 66).

#### 1.4.4 Óxido de grafeno reduzido

O grafeno, segundo definição da IUPAC, consiste em uma monocamada de átomos de carbono hibridizados na forma  $sp^2$ , formando ligações  $\sigma$  com outros três átomos de carbono, distribuídos em uma rede hexagonal bidimensional (2D), com uma extensa nuvem eletrônica formada de elétrons  $\pi$  conjugados (67). Devido a essa peculiar estrutura, o grafeno apresenta propriedades superiores as demais formas alotrópicas do carbono, tais como alta condutividade elétrica (superior à do silício) e térmica (superior à da prata), transparência, resistência mecânica (superior à do aço), flexibilidade e expressiva área superficial (68).

A forma de obtenção do grafeno envolve métodos que mesmo produzindo um material de excelente qualidade, inviabilizam a produção em larga escala, tanto pela pequena quantidade produzida, quanto pelo elevado custo de processamento. Além disso, a difícil manipulação e transferência do grafeno para a superfície do eletrodo como também sua insolubilidade em meio aquoso, restringe seu uso como modificador em sensores eletroquímicos, levando os cientistas a buscarem outros nanomateriais a base de grafeno com a intenção de contornar esses problemas (69).

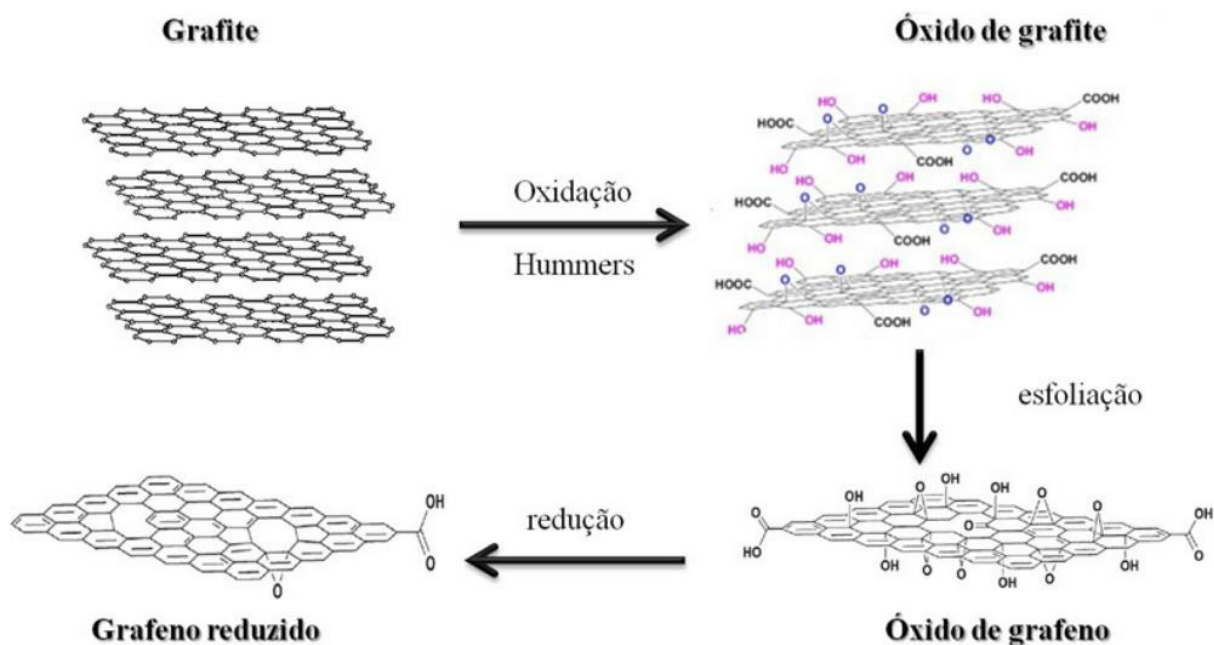
O óxido de grafeno (GO) é um material de fácil dispersão em água, o que facilita o seu manuseio e transferência para a superfície do eletrodo. Para sua produção, o grafite (que consiste estruturalmente em várias laminais de grafeno) passa por uma oxidação química, que introduz em sua estrutura grupos oxigenados (epóxi, hidroxila, carboxílicos e carbonila), que são intercalados entre as folhas de carbono, mudando sua hibridação de  $sp^2$  para  $sp^3$  e promovendo aumento da distância interplanar (69).

A introdução de grupos funcionais oxigenados faz com que o GO apresente vantagens em relação ao grafeno no que diz respeito a funcionalização do material. Um exemplo dessa funcionalização são os grupos epóxidos que são suscetíveis a ataques de substituição nucleofílica por grupos aminas ( $-NH_2$ ), o que torna interessante a imobilização de polímeros, biomoléculas e moléculas orgânicas (70). Além disso, o GO assim como o grafeno, apresenta elevada área superficial, que pode ser utilizada para a funcionalização com nanopartículas.

Embora a dispersão do GO melhore com a presença dos grupos oxigenados e o torna interessante para modificação de eletrodos, eles também o tornam um isolante elétrico. Diferente do grafeno, que possui somente carbonos  $sp^2$  conjugados em sua estrutura, o GO possui defeitos causados pela inserção dos grupos funcionais oxigenados, que acabam por interromper a conjugação devido ao surgimento de carbonos  $sp^3$ , ocasionando a perda da condutividade elétrica. Para contornar este problema, normalmente é realizada a redução do

GO para óxido de grafeno reduzido (RGO), que remove em grande parte os grupos oxigenados. O esquema da transformação dessas estruturas carbonáceas, são mostradas na Figura 4.

**Figura 4** - Esquema da obtenção do óxido de grafeno reduzido a partir do grafite.



Fonte: adaptado de Oliveira, et al. (71).

A redução do GO para RGO pode ser realizada por tratamento químico, eletroquímico, fotoquímico ou térmico (RGO), cujas propriedades térmicas, mecânicas e optoeletrônicas se assemelham bastante às do grafeno. Dentre essas técnicas de redução do GO, a eletroquímica é a mais utilizada quando se visa aplicações nesta área, já que o GO pode ser reduzido diretamente para RGO na superfície do eletrodo, como pode ser visto na Figura 4 (72). Além disso, a redução eletroquímica do GO permite um maior controle do grau de redução do material através da escolha da técnica eletroquímica utilizada. Assim, o GO pode ser reduzido através do controle de uma faixa de potencial e determinado número de ciclos através da técnica de voltametria cíclica (CV) ou por cronoamperometria, em que um potencial é aplicado durante um estipulado período de tempo.

Assim, a redução do GO via eletroquímica tem a vantagem de ser reproduzível e possibilitar o controle do grau de redução do material que pode depositado diretamente na superfície do eletrodo.

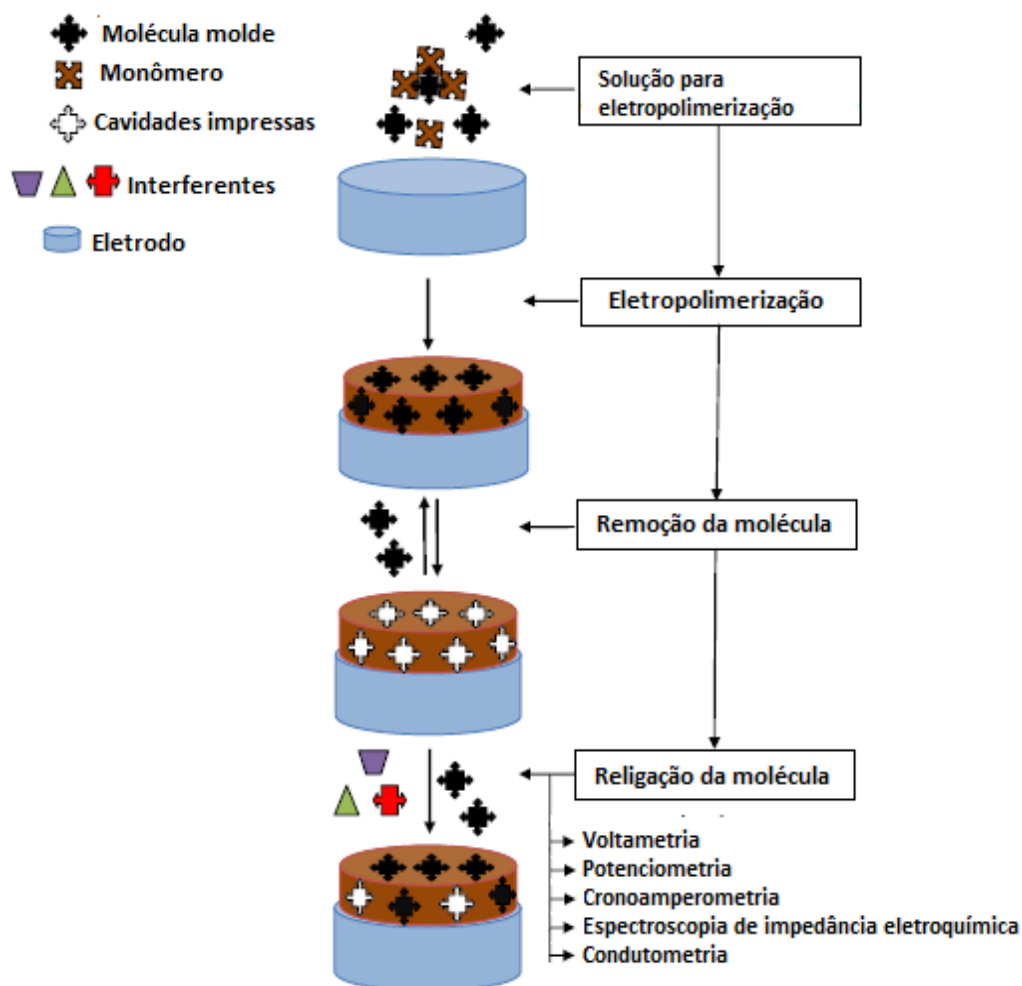
#### 1.4.5 Polímeros molecularmente impressos

Além da utilização de nanomateriais que fornecem boas performances ao sensor, a construção de dispositivos que sejam capazes de realizar o reconhecimento específico de uma molécula de interesse é um dos principais requisitos de um sensor, tornando a análise altamente seletiva e com amplo intervalo linear de trabalho.

Muitas das moléculas orgânicas que estão presentes em matrizes complexas, como é o caso da vinhaça de cana-de-açúcar, apresentam excelente resposta em eletrodos modificados, porém a seletividade pode ser comprometida devido ao similar comportamento eletroquímico dessas moléculas.

Um método eficiente para contornar esse problema é funcionalizar na superfície do eletrodo um polímero juntamente com a molécula de interesse, utilizando para isso a técnica de impressão molecular. Essa técnica, baseada em polímeros molecularmente impressos (MIP), vem se tornando um caminho promissor para preparar sensores feitos sob medida, com alta seletividade, confiabilidade e estabilidade mecânica, térmica e química (73, 74). O processo de impressão molecular envolve a polimerização do monômero funcional na presença da molécula alvo, que normalmente é a própria molécula de interesse na detecção ou uma molécula de tamanho e funcionalidade química semelhante (73). O monômero é capaz de interagir com a molécula e após a polimerização seus grupos funcionais são mantidos na mesma posição pela estrutura polimérica altamente reticulada. Após o término da polimerização, a extração da molécula dessa rede polimérica é realizada, criando cavidades que são complementares em tamanho e forma da molécula a ser determinada. Esse processo é muito semelhante a teoria “chave e fechadura” das enzimas e como resultado, a capacidade de reconhecimento pela estrutura polimérica da molécula alvo ocorre com uma seletividade muito alta (75), como podemos ver no esquema da Figura 5.

**Figura 5** - Esquema para a formação do MIP e métodos eletroquímicos de transdução do sinal.



Fonte: adaptado de Sharma et al. (76).

Os polímeros mais utilizados para formação da impressão molecular em sensores eletroquímicos são: poli-*o*-fenilenodiamina, polipirrol, poliaminofenol, polifenol, politiofeno, poli(aminofenilborônico) poliaminofenol, entre outros (77). Na literatura, polifenilenodiamina (o-PD) e polipirrol (PPy) se destacam na construção de sensores eletroquímicos baseados em MIP (78–81), pois são capazes de formar filmes finos e compactos, necessários para proporcionarem um tempo de resposta mais curto para o sensor, além de apresentarem alta estabilidade térmica e homogeneidade durante sua deposição. (82). Além disso, outra vantagem associada ao uso de PPy é a sua capacidade de incorporar ânions na sua estrutura durante a polimerização, tornando as moléculas orgânicas facilmente impressas [75].

Os MIPs são normalmente preparados por polimerização a partir da geração de radical livre, fotopolimerização ou eletropolimerização (83). Dentre esses métodos, a eletropolimerização se destaca por possibilitar um maior controle da espessura do filme eletrodepositado por meio das condições de eletropolimerização, como controle do potencial ou corrente aplicada.

A sensibilidade desses dispositivos está relacionada com a quantidade de sítios de impressão formados na superfície do sensor. Em eletrodos planares, a modificação enfrenta alguns obstáculos, incluindo a mobilidade restrita e aglomeração das cavidades, comprometendo a seletividade devido a fraca acessibilidade aos locais impressos. Contudo, a formação de superfícies nanoestruturadas parece ser um caminho promissor para superar esses problemas.

Comparadas as superfícies planares, as superfícies nanoestruturadas podem ser construídas com alta relação área/volume, como anteriormente mencionado, e com isso aumentar em número e proporção os locais disponíveis para a eletropolimerização. Esse aumento pode elevar a capacidade de impressão do MIP em até 15 vezes (84). Com base nisso, alguns pesquisadores têm-se concentrado na preparação de MIPs nanoestruturados, utilizando matrizes que possam aumentar ainda mais a quantidade de locais para impressão (43, 68, 76, 81).

## 2 OBJETIVOS

Conhecendo a importância dos polióis e da potencialidade do seu reaproveitamento a partir de vinhaça de cana-de-açúcar dentro do conceito de biorrefinarias, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de novos métodos para determinação desses compostos, empregando sensores eletroquímicos baseados em eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos em superfícies nanoestruturadas.

Os objetivos específicos desse trabalho, incluem:

- Modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido;
- Modificação do óxido de grafeno reduzido com nanopartículas de ouro e níquel por eletrodeposição;
- Construção do conjunto de nanoeletrodos arranjados tridimensionalmente (3DNEE);
- Estudar o comportamento eletroquímico dos polióis nos eletrodos modificados;
- Eletropolimerização de o-PD e PPy nos eletrodos modificados com AuNP/RGO, NiNP/RGO e 3DNEE e otimização dos melhores parâmetros experimentais para formação dos MIPs;
- Caracterização dos sensores eletroquimicamente através das técnicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), morfologicamente por meio da microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e quimicamente por meio da espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS);
- Desenvolvimento do método e obtenção das figuras de mérito;
- Realização do estudo dos possíveis interferentes, bem como verificar a estabilidade, reprodutibilidade e repetibilidade das medidas;
- Aplicação do método desenvolvido na determinação dos polióis em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar;
- Validação do método analítico desenvolvido utilizando ensaio de recuperação.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

Nesta seção serão detalhados os reagentes e equipamentos que foram utilizados para o desenvolvimento do trabalho, bem como os procedimentos realizados na preparação dos eletrodos modificados, na realização das medidas eletroquímicas, na caracterização e no desenvolvimento do método.

#### 3.1 Reagentes e soluções

Pirrol (pureza:  $\geq 98\%$ ), *o*-fenilenodiamina (pureza:  $\geq 98\%$ ), mio-inositol (pureza:  $\geq 98\%$ ), D-manitol (pureza:  $\geq 98\%$ ), óxido de grafeno (GO, pureza:  $> 95\%$ ), sulfato de níquel (pureza:  $> 95\%$ ), ferricianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ , pureza:  $99\%$ ), ácido cloroáurico ( $\sim 52\%$  de ouro), ferrocenilmetilamina ( $> 97\%$ ) cloreto de potássio, di-hidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato de dipotássio, perclorato de lítio, sulfato de sódio, acetonitrila ( $99.8\%$ ), ácido acético glacial ( $99.8\%$ ), ácido trifluoroacético ( $\geq 99\%$ ), nitrato de prata ( $\geq 99\%$ ), nitrato de sódio ( $\geq 99\%$ ), iodeto de (ferrocenilmetil)trimetilamônio ( $98\%$ ) e hexafluorofosfato de potássio ( $\geq 99\%$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Formaldeído, ácido acético glacial ( $99.8\%$ ), ácido nítrico, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, sulfito de sódio, metanol e solução amoniacal foram adquiridos da Merck. Também foram utilizados nitrato de sódio (Aldrich), ácido fosfórico (Carlo Erba) e solução comercial Oromerse, da Technic Inc., a base de  $Au(SO_3)_2^{3-}$ .

Membranas de filtração de policarbonato (SPI-PORE, diâmetro do filtro de 47 mm, espessura do filtro de 6,0 mm, com  $6,0 \times 10^8$  poros  $cm^{-2}$ ) com diâmetro nominal dos poros de 80 nm foram utilizados como molde na preparação dos NEEs. Para a remoção de uma parte da membrana, foi utilizada uma fita adesiva da marca 3 M (scotch Magic™).

Foram preparadas soluções de tampão acetato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 5,0 e tampão fosfato ( $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ) de pH 6,0 e 6,5. Solução de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} K_3Fe(CN)_6$  foram preparadas em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.

Para a obtenção do hexafluorofosfato de (ferrocenilmetil)trimetilamônio ( $Fa^+PF_6^-$ ), 5,0 g de iodeto de (ferrocenilmetil)trimetilamônio foram dispersos em 60 mL de água e colocadas em banho de gelo. Após isso, sob agitação, foram adicionados 7,36 g de hexafluorofosfato de potássio. O sólido amarelo precipitado foi filtrado e deixado em estufa a  $100^\circ C$  por algumas horas [28].

Para a preparação de todas as soluções foi utilizada água deionizada (MILLI-Q), com resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm.

### 3.2 Equipamentos

Os estudos eletroquímicos foram realizados em um Autolab PGSTAT 100 potenciostato-galvanostato controlado pelo software NOVA, 1.1. Os estudos eletroquímicos dos 3DNEEs e a formação do sensor para L-arabitol foram realizados em um CH Instruments modelo CHI 620 A, com seu respectivo software CHI 620 A Electrochemical Analyser, disponibilizado pelo Department Molecular Sciences & Nanosystems da University Ca' Foscari of Venice, Itália.

Os experimentos foram feitos em uma célula eletroquímica convencional contendo três eletrodos; o eletrodo de trabalho constituído por carbono vítreo ( $d = 3$  mm), o eletrodo referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>) e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas à temperatura ambiente.

Com a finalidade de caracterizar o sensor eletroquímico, a espectroscopia de impedância eletroquímica, EIS (do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*), foi realizada no potencial de 0,22 V em uma faixa de frequência de 0,10 Hz a 100 kHz.

Para estudar a morfologia da superfície, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo da marca Jeol, modelo JSM 7500F. Também foi utilizado um microscópio de força atômica para análises de AFM (do inglês *atomic force microscopy*) no modo tapping da marca Bruker nonoscope V. As superfícies modificadas foram analisadas em um suporte de amostra de 2,0  $\mu\text{m} \times 2,0 \mu\text{m}$  e a área de amostra foi exibida com uma resolução de 256  $\times$  256 pixels, sendo a velocidade de varredura de 2,0  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microscopia Avançada, LMA-IQ.

Para a análise de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X ou XPS (do inglês *X-ray photoelectron spectroscopy*), um espectrômetro comercial (UNI-SPECS UHV) foi utilizado a uma pressão inferior a 10<sup>-7</sup> Pa. Para excitação dos fotoelétrons foi utilizada a radiação MgK $\alpha$  ( $h\nu = 1253,6$  eV). Os espectros de alta resolução foram medidos com uma energia de passagem do analisador de 10 eV. O fundo inelástico dos picos de fotoemissão do Au4f, Ni1s, N1s, O1s e C1s foi subtraído usando o método de Shirley. A composição (em %) da região de superfície próxima foi determinada com uma exatidão de  $\pm 10$  % da proporção das áreas de pico relativas corrigidas pelos fatores de sensibilidade de Scofield dos elementos

correspondentes. O componente C1s, de valor fixo de 285,0 eV. foi utilizado para corrigir a escala de energia de ligação dos espectros. Na análise estrutural os espectros foram deconvoluídos utilizando funções Pseudo-Voigt, combinações Gaussianas e Lorentzianas. A largura à meia altura variou entre 1,2 e 2,1 eV e o erro da posição dos picos foi de  $\pm 0,10$  eV.

Para a obtenção de MIPs altamente seletivos, é reconhecido que a interação entre o monômero e a molécula molde é um dos fatores cruciais na síntese satisfatória destes materiais. Desta forma, simulações computacionais foram realizadas a fim de se obter informações sobre qual a melhor interação entre os polióis e os monômeros disponíveis comercialmente e que são comumente empregados na síntese eletroquímica de MIP, como anilina, pirrol e o-fenilenodiamina.

Para isto, foram empregados os seguintes programas:

1. HyperChem® 8.0.5: utilizado para modelagem das moléculas a serem utilizadas na síntese dos MIP.
2. OpenEye® (pacote de *softwares*) contendo os programas:
  - *VIDA 3.0.0*: utilizado para visualizar as moléculas modeladas e para conferir possíveis erros de ligações entre átomos.
  - *Omega2*: gera diversos confôrmeros das moléculas, o que torna possível levar em consideração possíveis impedimentos espaciais. Por padrão, são gerados 10 confôrmeros de cada polioliol, sendo escolhidos 3 ao acaso para realizar os testes simulatórios.
  - *Szybki 1.2.2*: programa que leva a molécula até seu estado de menor energia e, portanto, mais estável.
3. AutoIt 3.3.6.0: aplicativo que utiliza linhas de comandos (*scripts*) para automatizar processos repetitivos durante a modelagem molecular, eliminando erros humanos durante os procedimentos.
4. Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) com MOPAC (Molecular Orbital PACkage) 2009: utilizado para realizar as simulações propriamente ditas. Este programa faz a aproximação dos monômeros com a molécula que será usada como molde calculando a energia liberada, resultando assim a afinidade entre os mesmos. MOPAC é um utilitário que emprega química quântica semi-empírica para os cálculos de aproximação.

Os resultados obtidos através da simulação computacional são mostrados no Apêndice A.

### 3.3 Limpeza do GCE

O GCE foi polido mecanicamente com pó de alumina de 0,30  $\mu\text{m}$  em tecido de feltro e eletroquimicamente por voltametria cíclica com sucessivas varreduras na faixa de potencial de -0,50 a + 1,5 V (*vs.* Ag/AgCl) a 50  $\text{mV s}^{-1}$  em 0,50  $\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , até a obtenção de um voltamograma estável, confirmando que sua superfície estava livre de qualquer substância adsorvida.

### 3.4 Modificação do GCE com RGO

A suspensão em água de 4,0  $\text{mg mL}^{-1}$  de óxido de grafeno foi deixada em banho de ultrassom por 4 horas para esfoliação de suas camadas. Após isso, a suspensão foi diluída em solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a fim de se obter a concentração final de 0,50  $\text{mg mL}^{-1}$  de óxido de grafeno em 0,10  $\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Para a eletroredução do GO na superfície do GCE, um potencial de -1,5 V (*vs.* Ag/AgCl) foi aplicado por 500 s, para obtenção do RGO-GCE.

### 3.5 Preparação do AuNP/RGO-GCE

Após a secagem do RGO à temperatura ambiente, o eletrodo foi colocado em uma solução de 0,50  $\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  contendo  $6,0 \times 10^{-4}$   $\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{HAuCl}_4$  e o potencial de + 0,40 V (*vs.* Ag/AgCl) foi mantido por 600 s. Em seguida, o RGO-GCE modificado com as nanopartículas de ouro foi removido da solução de eletrodeposição, lavado cuidadosamente com água deionizada e colocado em solução de 0,10  $\text{mol L}^{-1}$  de NaOH e submetido a 20 ciclos de varredura no potencial de -0,30 a + 0,50 V (*vs.* Ag/AgCl) a 100  $\text{mV s}^{-1}$ , para formação do óxido / hidróxido de ouro.

### 3.6 Formação do MIP sobre o AuNP/RGO-GCE para determinação de D-manitol

Para realizar a eletropolimerização sobre a superfície de AuNP/RGO-GCE, o eletrodo modificado foi colocado em uma solução contendo  $5,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de D-manitol e  $3,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de *o*-fenilenodiamina em meio de 0,10 mol L<sup>-1</sup> de tampão acetato pH 4,8. Por voltametria cíclica, entre os potenciais de -0,40 a + 1,0 V (*vs.* Ag/AgCl), o eletrodo foi submetido a 27 ciclos consecutivos a uma velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>. Após isso, o eletrodo foi lavado com tampão acetato pH 4,8 para interromper o processo de polimerização e deixado secar a temperatura ambiente.

Para remoção da molécula de D-manitol da rede polimérica e consequente formação das cavidades, o eletrodo foi colocado em solução contendo acetonitrila-ácido acético na proporção 5:2 (v/v) durante 1 min, sob suave agitação (~50 rpm). Após isso, o eletrodo foi lavado com água deionizada e pronto para ser utilizado.

Para comparação dos resultados, um eletrodo não-impreso (NIP) foi construído seguindo o mesmo procedimento, porém sem a adição da molécula de D-manitol na etapa de eletropolimerização, a fim de avaliar a efetividade do uso do MIP.

### 3.7 Preparação do NiNP/RGO-GCE

A modificação do eletrodo de RGO-GCE com as nanopartículas de níquel (NiNP/RGO-GCE), foi semelhante ao descrito por Da Silva et al, (85) com algumas modificações. As NiNPs foram eletrodepositadas utilizando uma solução contendo  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de NiSO<sub>4</sub> em meio de 0,10 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sob um potencial constante de -1,3 V (*vs.* Ag/AgCl) até que a carga de 5,0 mC fosse atingida. Em seguida, o eletrodo modificado com as nanopartículas de níquel foi removido da solução de eletrodeposição, lavado cuidadosamente com água deionizada e colocado em solução contendo 0,10 mol L<sup>-1</sup> de NaOH e submetido a 30 sucessivos ciclos na faixa de potencial de 0,10 a 0,70 V (*vs.* Ag/AgCl) a 50 mV s<sup>-1</sup>, para a formação do óxido-hidróxido de níquel.

### 3.8 Formação do MIP sobre NiNP/RGO-GCE para determinação de mio-inositol

O NiNP/RGO-GCE foi colocado em uma solução de 0,10 mol L<sup>-1</sup> de LiClO<sub>4</sub> contendo  $7,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de mio-inositol e  $2,5 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de pirrol. A eletropolimerização foi realizada por voltametria cíclica no intervalo de 0,0 V a 1,0 V (*vs.* Ag/AgCl) a 50 mV s<sup>-1</sup> durante

10 ciclos. Após esse processo, o eletrodo foi lavado com  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{LiClO}_4$  para interromper o processo de polimerização.

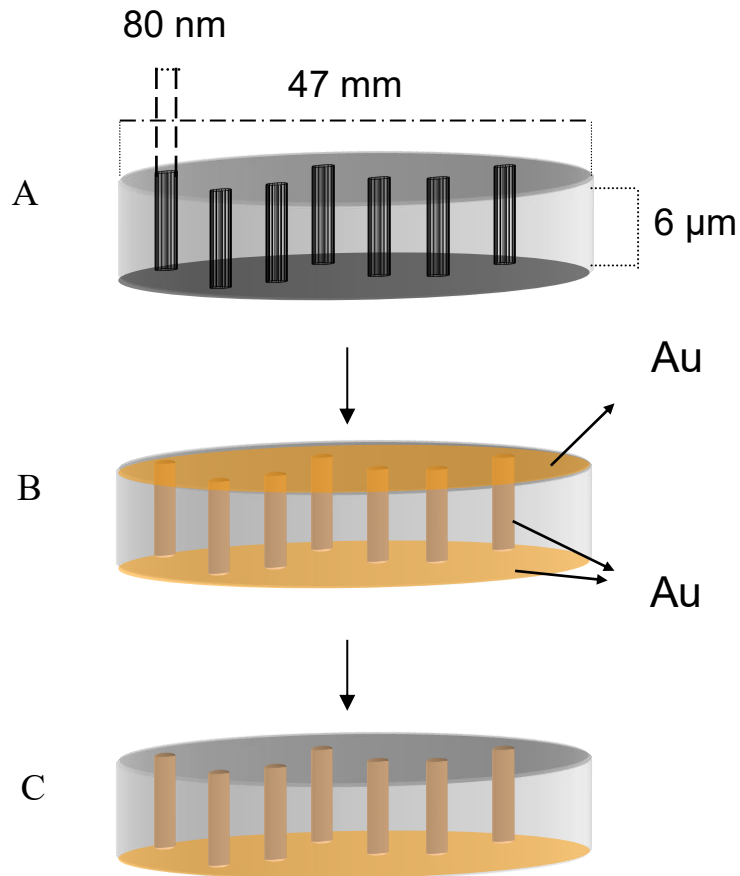
Para a formação das cavidades impressas, o eletrodo polimerizado foi superoxidado em solução de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{NaOH}$ , na faixa de potencial de  $0,0 \text{ V}$  a  $1,8 \text{ V}$  (*vs.*  $\text{Ag/AgCl}$ ) a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , por 10 ciclos. Este processo foi capaz de remover as moléculas de mio-inositol presas na matriz polimérica, formando cavidades que têm o mesmo tamanho e forma da molécula molde. Para controle do processo, um eletrodo modificado não impresso (NIP/NiNP/RGO-GCE) foi preparado nas mesmas condições experimentais porém sem adição de mio-inositol.

### 3.9 Preparação do 3DNEE

O 3DNEE foi preparado com base no procedimento descrito por De Léo et al, (58). Primeiramente uma membrana de policarbonato (PC) foi imersa durante 4 h em metanol. Após esse período, foi retirada e colocada em outra solução contendo  $0,026 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{SnCl}_2$  e  $0,07 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido trifluoroacético, em meio de 50 % metanol – 50 % água durante 45 min. Depois, a membrana foi enxaguada com metanol e mergulhada em  $0,026 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Ag}[(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3]$  durante 10 min e em seguida lavada novamente com metanol e depois com água deionizada e na sequência imersa em uma solução contendo  $7,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{Na}_3\text{Au} (\text{SO}_3)_2$  em meio de  $0,127 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  em um banho a  $0^\circ\text{C}$ . Após 20 min, foi adicionada a esta solução  $0,625 \text{ mol L}^{-1}$  de formaldeído e por um período de 24 h ocorreu a deposição química do ouro na membrana. Após este período, a membrana revestida com ouro foi lavada com água e imersa em solução de  $\text{HNO}_3$  10% durante 12 horas, enxaguada com água e seca a temperatura ambiente.

Na deposição, nanofios de ouro cresceram dentro dos poros e em ambos os lados da face da membrana. O lado liso da membrana foi removido com uma fita adesiva para que as pontas dos nanofios permanecessem expostas de um lado. Todos os nanofios são interconectados um ao outro por uma camada traseira de ouro que atua como coletor de corrente. A Figura 6 ilustra a membrana de PC (a), o processo de crescimento dos nanofios de ouro nos poros da membrana (b) e a remoção da camada superficial de ouro (c).

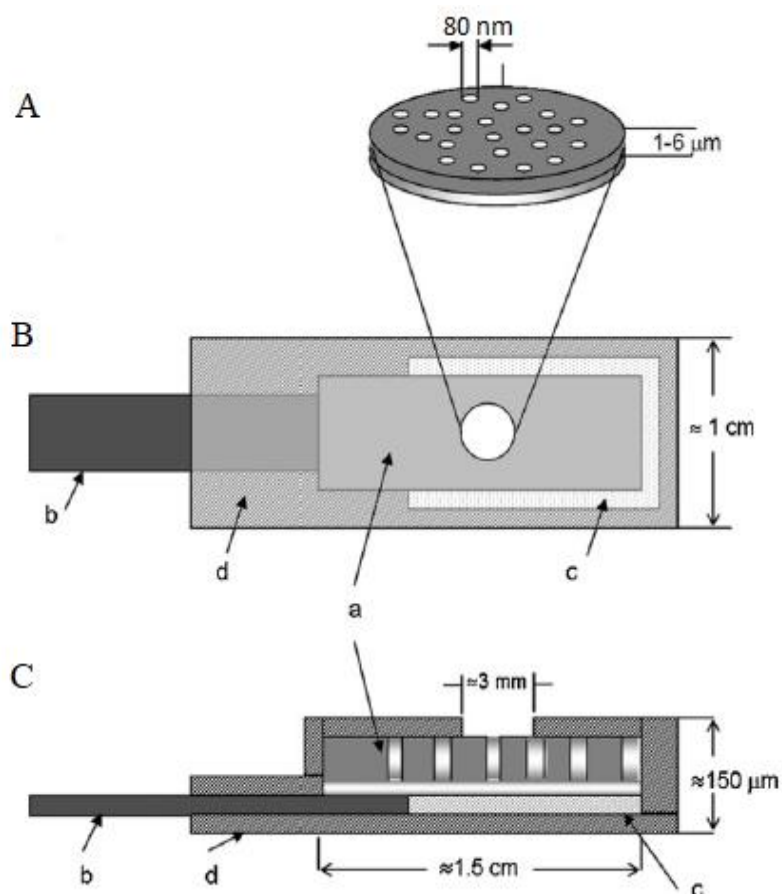
**Figura 6** - (a) Membrana de PC, (b) processo de crescimento dos nanofios de ouro nos poros da membrana e (c) remoção da camada superficial de ouro.



Fonte: elaborado pelo autor.

A montagem dos eletrodos foi realizada de acordo com Ongaro et al, (86). Primeiramente, um pedaço de fita adesiva de cobre com cola condutora ( $5,0 \times 60$  mm) foi fixado em um pequeno adesivo quadrado de alumínio. Sobre o alumínio, um pequeno pedaço da membrana de ouro ( $5$  mm  $\times$   $5$  mm) foi colocado de modo que apenas uma pequena parte fique em contato com a fita de cobre. Finalmente um pedaço maior de uma fita adesiva não condutora com filamentos de vidro foi aplicada no lado inferior e superior para isolar a fita de alumínio e cobre. Um orifício circular com diâmetro de 2,1 mm foi perfurado na parte superior da fita isolante anterior. Este furo define a área geométrica do conjunto de nanoeletrodos, que é a área exposta à solução. A Figura 7 ilustra essa montagem.

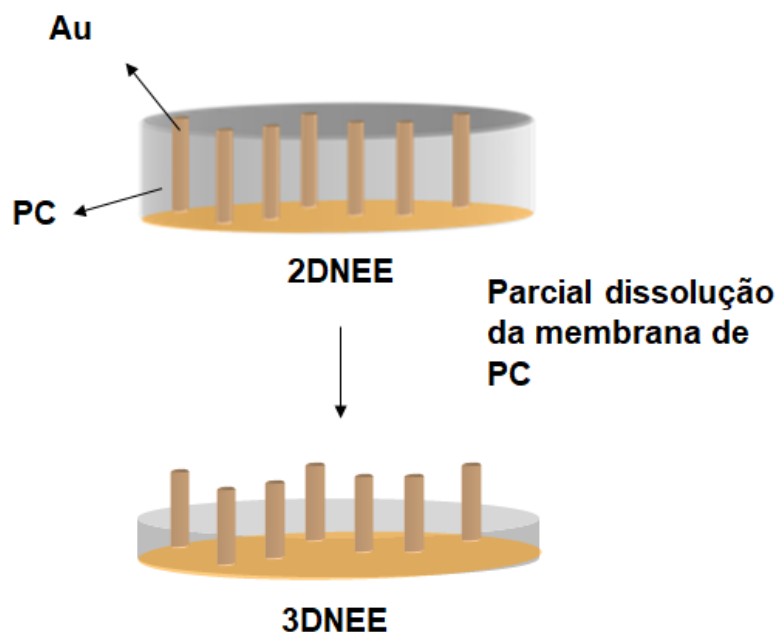
**Figura 7** - Esquema do preparo do NEE usando uma membrana de policarbonato. (A) Uma parte da membrana de PC contendo os nanoeletrodos; (B) vista superior; (C) NEE para uso como eletrodo de trabalho. (a) Membrana contendo nanoeletrodos, (b) fita adesiva de cobre para conectar à instrumentação, (c) fita adesiva de alumínio, (d) fita isolante com filamentos de vidro. Adaptado de Ongaro et al, [85]



Fonte: Ongaro et al.(86).

Para obter o 3DNEE, o eletrodo foi imerso em uma solução contendo diclorometano-etanol na proporção 1:9 (v/v) durante 10 s, para dissolução parcial da membrana de PC (*etching process*) e exposição dos nanofios, como mostra a Figura 8. Em seguida, o eletrodo foi enxaguado com etanol para interromper o processo e finalmente enxaguado abundantemente com água.

**Figura 8** - Dissolução parcial da membrana de PC para formação do 3DNEE.



Fonte: elaborado pelo autor.

### 3.10 Formação do MIP sobre 3DEE para determinação de L-arabitol

Após a preparação do 3DNEE, a eletropolimerização foi realizada em tampão acetato pH 4,8, contendo  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de L-arabitol e  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de o-PD, por 30 ciclos entre - 0,40 a 1,0 V (vs. Ag/AgCl), com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Após a eletropolimerização, o eletrodo MIP/3DNEE foi enxaguado em solução tampão acetato pH 4,8 para remover a o-PD não polimerizada. Após isso, as moléculas de L-arabitol presas na rede polimérica do MIP foram removidas por imersão em uma solução de etanol 70 % durante 60 s à temperatura ambiente, sob suave agitação ( $\sim 50 \text{ rpm}$ ). Para comparação dos resultados, um eletrodo não impresso (NIP/3DNEE) foi eletropolimerizado seguindo o mesmo procedimento, porém sem adição das moléculas de L-arabitol.

### 3.11 Medidas experimentais

As medidas experimentais utilizando os eletrodos modificados MIP/AuNP/RGO-GCE e MIP/NiNP/RGO-GCE foram realizadas em célula eletroquímica contendo  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em meio de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. Voltamogramas cíclicos foram registrados entre - 0,20 e 0,60 V (vs. Ag/AgCl), com velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Voltametria de

pulso diferencial (DPV) também foi utilizada para as análises, na faixa de potencial de - 0,20 a + 0,50 V (*vs.* Ag/AgCl), com amplitude de potencial de pulso de 50 mV, tempo de duração do pulso de 50 ms e velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>.

Para os nanoelectrodos (3DNEE), os CVs foram registrados na faixa de potencial entre 0,20 e 0,70 V (*vs.* Ag/AgCl) a uma velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>. DPV foi realizada na faixa de 0,0 a 0,60 V (*vs.* Ag/AgCl), com amplitude de potencial de pulso aplicado de 50 mV, tempo de pulso de 50 ms e velocidade de varredura de 5,0 mV s<sup>-1</sup>. A solução de 1,0 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de FA<sup>+</sup> em meio de 5,0 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub> foi escolhida como sonda eletroquímica para estudar o desempenho do sensor preparado.

As figuras de mérito, incluindo limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e sensibilidade amperométrica (Sa) foram calculados de acordo com a equação  $LOD = 3,0 SD / S$  e  $LOQ = 10 SD / S$ , onde SD é o desvio padrão do intercepto, e S é a inclinação da curva de calibração.

### **3.12 Determinação dos polióis em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar.**

As amostras de vinhaça de cana-de-açúcar foram centrifugadas a 4000 rpm durante 20 min visando a remoção das partículas sólidas. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtros de 0,47 e 0,22 µm de porosidade. Em seguida, a vinhaça filtrada foi diluída em PBS pH 6,0 a fim de obter uma concentração final adequada ao método desenvolvido para cada sensor. As soluções dos polióis de interesse foram adicionadas à amostra para a determinação analítica pelo método de adição padrão. Os testes de recuperação foram feitos adicionando uma solução de concentração definida do analito às amostras para validação do método.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está dividida em quatro principais subseções, as quais tratam sobre o eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido, o eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de ouro para eletropolimerização com *o*-fenilenodiamina e D-manitol (MIP/AuNP/RGO-GCE), o eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de níquel para eletropolimerização com pirrol e mio-inositol (MIP/NiNP/RGO-GCE) e por último a formação do conjunto de nanoeletrodos arranjos tridimensional para eletropolimerização com *o*-fenilenodiamina e L-arabitol (MIP/3DNEE). Em cada subseção, os estudos eletroquímicos, as caracterizações, o desempenho analítico e a aplicação na amostra de cada sensor desenvolvido, são discutidos.

### 4.1 Redução do óxido de grafeno em eletrodo de carbono vítreo

Apesar da grande quantidade de informações publicadas nos últimos anos a respeito do grafeno, há muito pouco progresso no sentido de utilizar a eletroquímica para redução do seu óxido na superfície de dispositivos (87). A eletrodeposição se destaca pela simplicidade e por ser um método menos dispendioso e adequado para a produção em massa, mesmo quando aplicado em grandes áreas. Em princípio, a eletrodeposição é altamente controlável e capaz de produzir filmes sem a necessidade de solventes voláteis ou agentes redutores, que podem contaminar a superfície do eletrodo e reduzir completamente as funcionalidades dos grupos oxigenados. Além disso, uma vez reduzido, o RGO já está presente na superfície do eletrodo, pronto para ser utilizado.

Uma importante propriedade do óxido de grafeno (GO), provocada pela natureza hidrofílica das camadas de grafeno oxigenadas, é a sua fácil esfoliação em meios aquosos que resulta em estáveis suspensões coloidais em camadas de água. Experiências mostram que a adição de um eletrólito suporte na suspensão de GO é essencial para que ocorra a sua eletrodeposição (87). Porém, o excesso de eletrólito (ácido, básico ou neutro), resulta na desestabilização das partículas suspensas de GO, ocasionando sua aglomeração e perda de suas propriedades. O GO contém grupos funcionais aniônicos (como carboxilatos e fenolatos) e a dissociação parcial destes grupos resulta em cargas negativas ligados à superfície da partícula. Em suspensão, esses grupos são responsáveis pela formação de uma camada eletrizada que circunda as folhas do GO. Essa camada estabiliza as folhas do GO em suspensão, evitando-as fisicamente de aglomerar. A espessura dessa dupla camada diminui quando o GO é colocado

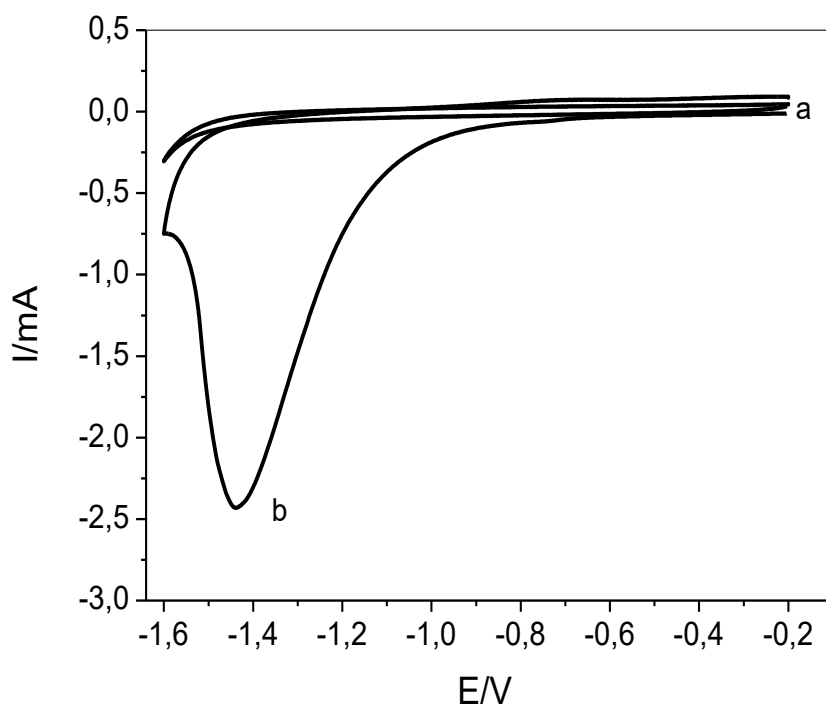
em solução contendo eletrólito. Assim, a escolha do eletrólito para realizar a eletrodeposição do GO é de grande importância para se obter uma suspensão sem aglomeração e eletroativa.

A eletrodeposição é possível sobre um amplo intervalo de pH, porém em meio ácido há reações concorrentes com a redução do GO, como a redução de  $H^+$  com consequente formação de bolhas de hidrogênio, que criam uma barreira física impedindo as partículas de aderir ao eletrodo de trabalho, interferindo no processo. Assim, na região neutra não há interferência de reações secundárias, sendo essa preferível (87).

Uma avaliação qualitativa da suspensão de GO em diferentes eletrólitos foi feita visualmente. Assim,  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  de GO foi deixado em banho de ultrassom por 4 horas para esfoliação de suas camadas e em seguida diluído 1:1 (v/v) em meio de  $0,10$  e  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  de  $Na_2SO_4$ , e de  $0,10$  e  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  de  $KCl$ , a fim de se escolher o melhor eletrólito suporte para efetuar a eletrodeposição na superfície do GCE. Foi observado aglomeração da suspensão do GO em todas as concentrações de  $KCl$ . Já para o eletrólito de  $Na_2SO_4$ , não foi observado aglomeração de partículas quando a concentração final, após a diluição com  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  de GO, foi de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , sendo então o eletrólito escolhido para os estudos seguintes.

Foi também estudado em qual potencial a suspensão de  $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$  GO em meio de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$   $Na_2SO_4$  (concentração final após diluição), se reduz na superfície do GCE. Para isso, foi realizada uma varredura cíclica entre os potenciais de  $-1,6 \text{ V}$  a  $-0,2 \text{ V}$  a fim de se obter o potencial de redução do GO, como mostra a Figura 9. Por meio do voltamograma obtido, é possível observar que em aproximadamente  $-1,5 \text{ V}$  o GO apresenta um pico de redução, evidenciando a formação do RGO na superfície do eletrodo.

**Figura 9** - Voltamograma cíclico para GCE em (a) 0,10 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e (b) 0,50 mg mL<sup>-1</sup> de GO em meio de 0,10 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  $\nu = 50$  mV s<sup>-1</sup>.



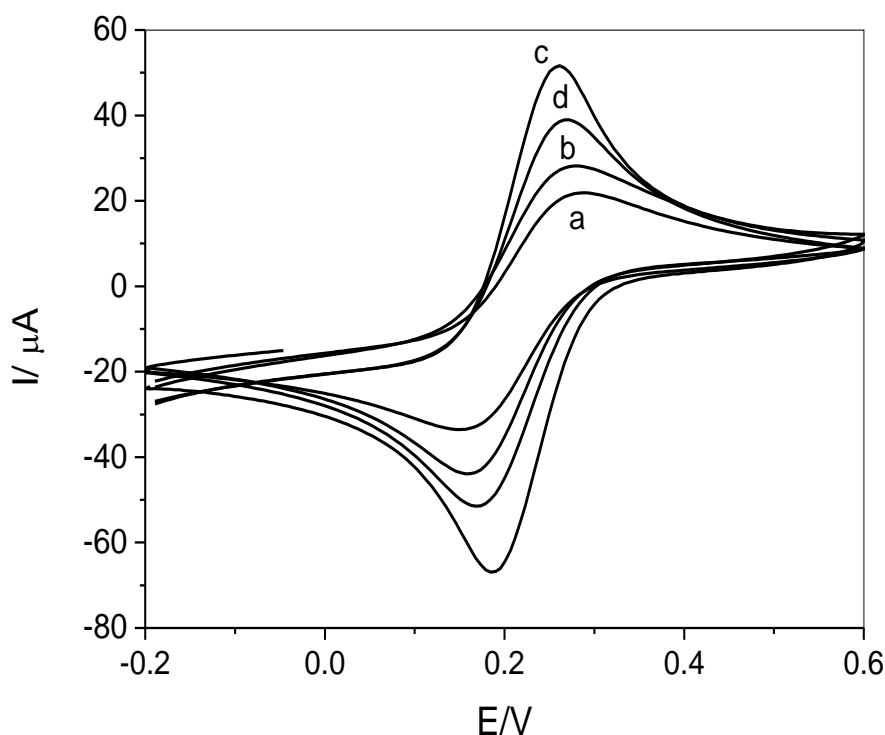
Fonte: elaborado pelo autor.

Além disso, também foi avaliado a melhor concentração das suspensões de GO para formação do eletrodo RGO-GCE. Para isto, foram preparadas soluções contendo 0,25, 0,50 e 0,75 mg mL<sup>-1</sup> de GO em 0,10 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e em um potencial de -1,5 V foi inicialmente aplicado por 600 s usando cronoamperometria. Após a modificação, o RGO-GCE foi seco e colocado em solução de 0,10 mol L<sup>-1</sup> de KCl contendo  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> para estudo do comportamento eletroquímico.

Analisando a Figura 10 é possível observar que para o eletrodo modificado na concentração de 0,25 mg mL<sup>-1</sup> de GO, o valor da corrente de pico foi 1,8 vezes maior quando comparado com o eletrodo sem nenhuma modificação. Quando a concentração de GO foi de 0,50 mg mL<sup>-1</sup> houve um ganho ainda maior na corrente, cerca de 2,5 vezes. Esses aumentos na corrente anódica e catódica do Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> podem ser relacionados com o aumento da área eletroativa (Ae) que o material proporcionou na superfície do eletrodo, como mostra a Tabela 2. Já para a concentração de 0,75 mg mL<sup>-1</sup> de GO o ganho de corrente diminuiu, sendo somente de 1,2 vezes. Esses resultados indicam que a transferência de elétrons foi facilitada quando o

GCE foi modificado com GO e mais pronunciada quando o filme foi mais fino. Porém, em  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  de GO esse efeito não foi observado, provavelmente porque essa concentração foi insuficiente para realizar uma cobertura completa da superfície do GCE. Assim, a concentração de  $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$  de GO foi escolhida para dar continuidade aos estudos.

**Figura 10** - Voltamogramas cíclicos de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl contendo  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em (a) carbono vitreo e contendo (b)  $0,25$  (c)  $0,50$  e (d)  $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$  de GO eletrodepositado,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

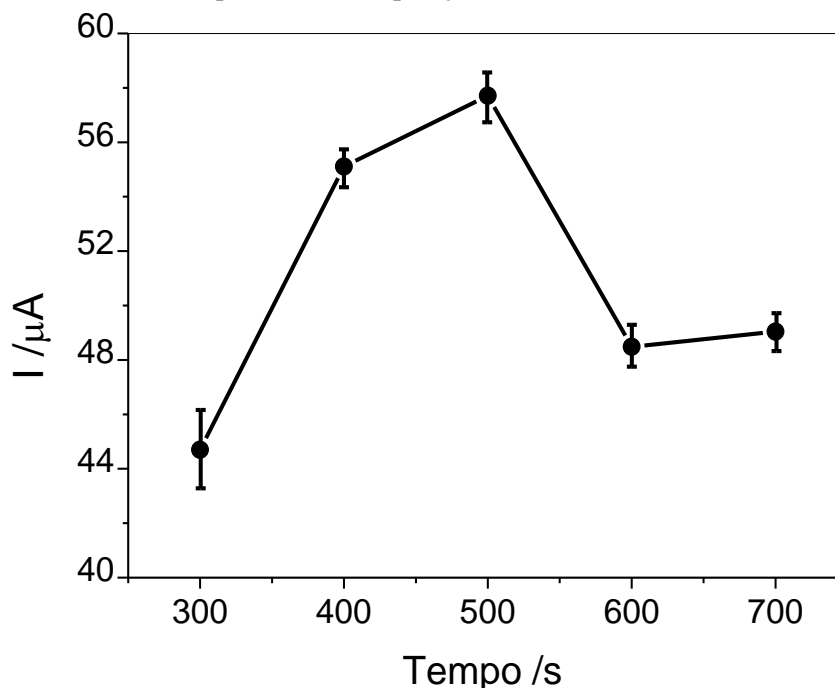


Fonte: elaborado pelo autor.

Outro importante parâmetro analisado foi o tempo de eletrodeposição do GO. Para isso, o eletrodo de GCE foi colocado em solução contendo  $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$  de GO em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e foi aplicado o potencial de  $-1,5 \text{ V}$ . O tempo de eletrodeposição foi estudado na faixa de 300 a 700 s. Este é um parâmetro importante na modificação do eletrodo, pois permite que a espessura do filme de RGO seja controlada. A Figura 11 mostra como a corrente anódica de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl foi alterada em diferentes tempos de eletrodeposição. Analisando a figura é possível observar um crescente ganho na corrente até o tempo de 500 s, indicando que este foi o tempo ótimo para a cobertura do eletrodo de GCE pelo filme RGO. Após esse tempo a corrente decaiu, indicando que a superfície do eletrodo foi

saturada de RGO, ou seja, um filme mais espesso foi formado, o que afetou a transferência de elétrons para a superfície do eletrodo.

**Figura 11** - Variação da corrente anódica para a oxidação de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl contendo  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em diferentes tempos de eletrodeposição, contendo  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em diferentes tempos de eletrodeposição.



Fonte: elaborado pelo autor.

A fim de comprovar que o ganho de corrente do par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  está relacionado com o aumento da  $A_e$ , os voltamogramas apresentados na Figura 10 foram utilizados para calcular os parâmetros voltamétricos do GCE e do RGO-GCE, uma vez que a corrente de pico pode ser descrita pela equação de Randles-Ševick (88).

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

Em que  $I_p$  corresponde a corrente de pico,  $n$  o número de elétrons envolvido,  $A_e$  a área eletroativa do eletrodo,  $D_o$  o coeficiente de difusão,  $C$  a concentração da espécie eletroativa e  $v$  a velocidade de varredura. Os parâmetros da equação de Randles-Ševick conhecidos para o par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  são:  $n$  igual a 1,  $D_o$  igual a  $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  e  $C$  igual a  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$  e assim foi possível obter a área eletroativa ( $A_e$ ), a partir do coeficiente angular obtido para as relações de corrente de pico anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de

varredura (não demonstrado) com o coeficiente angular da Equação 1, para os eletrodos de GCE e RGO-GCE [87].

Os dados de corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ), corrente de pico catódica ( $I_{pc}$ ),  $I_{pa}/I_{pc}$  e potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ), potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ) e área eletroativa ( $A_e$ ) se encontram na Tabela 2:

**Tabela 2** - Parâmetros voltamétricos na oxi-redução de  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  em GCE e RGO-GCE.

<b>Eletrodo</b>	<b><math>E_{pa}</math> (V)</b>	<b><math>E_{pc}</math> (V)</b>	<b><math>\Delta E_p</math> (V)</b>	<b><math>I_{pa}</math> (<math>\mu A</math>)</b>	<b><math>I_{pc}</math> (<math>\mu A</math>)</b>	<b><math>I_{pa}/I_{pc}</math> (<math>\mu A</math>)</b>	<b><math>A_e</math> (<math>cm^2</math>)</b>
GCE	0,29	0,21	0,08	15	13	1,1	0,069
RGO-GCE	0,26	0,17	0,09	29	29	0,99	0,19

Fonte: elaborado pelo autor.

Analisando a Tabela 2, notamos que após a modificação do CGE pelo RGO houve um ganho na  $A_e$  de 1,95 vezes, que conseqüentemente contribuiu para que a corrente de pico na oxi-redução de par  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  também aumentasse.

Assim, para a modificação da superfície de GCE com RGO foi utilizada a concentração de  $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$  de GO em meio de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de  $Na_2SO_4$  e o potencial aplicado foi de  $-1,5 \text{ V}$  pelo período de 500 s. Após esse tempo, o eletrodo RGO-GCE foi retirado da solução, deixado secar a temperatura ambiente e pronto para ser utilizado nas próximas etapas do trabalho.

## 4.2 Formação do MIP/AuNP/RGO-GCE para determinação de D-manitol

Nas subseções a seguir serão discutidos os resultados referentes a modificação do RGO-GCE com AuNP, bem como a eletropolimerização de o-PD juntamente com as moléculas de D-manitol para formação do MIP/AuNP/RGO-GCE. Também será abordada a sua caracterização eletroquímica, química e morfológica através de diversas técnicas de caracterização e também o desenvolvimento do método analítico e sua aplicação na determinação de D-manitol em vinhaça de cana-de-açúcar.

### 4.2.1 Eletrodeposição de AuNP em RGO-GCE

A eletrodeposição potencioestática de nanopartículas de ouro sobre a superfície de RGO-GCE foi realizada a fim de promover a eletrooxidação dos polióis. Como podemos observar na Figura 12b, o eletrodo modificado com RGO-GCE não exibiu corrente significativa na oxidação da molécula de D-manitol como já descrito por Baldwin et al (89), porém quando o eletrodo foi modificado com nanopartículas de óxido de ouro, um pico de oxidação foi observado em 1,0 V, como mostra a Figura 12a.

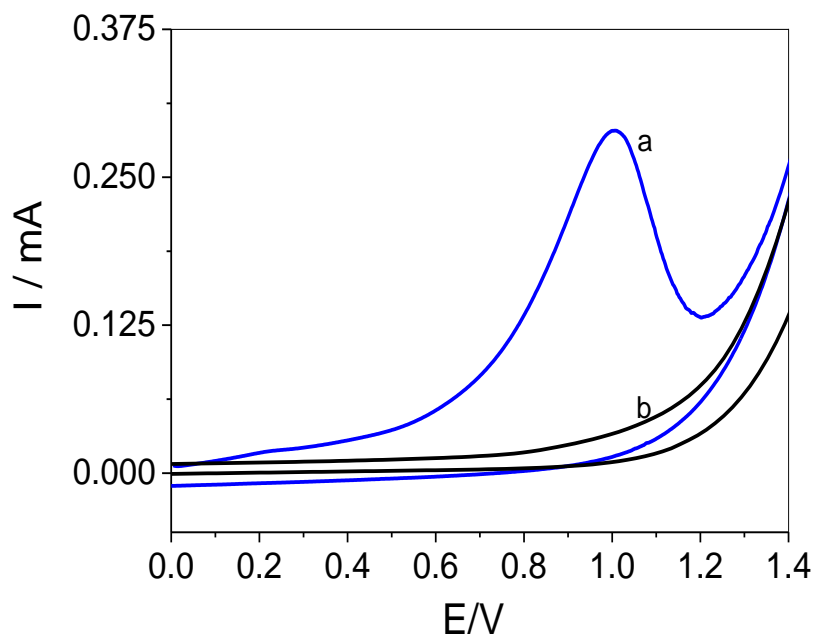
As nanopartículas metálicas de Au mostram uma pequena corrente catalítica na oxidação de carboidratos e derivados em meio ácido, devido à não formação do óxido de ouro hidratado catalítico em solução ácida. Esse óxido catalítico é formado apenas em solução alcalina, por quimiosorção de íons hidróxido na superfície do ouro (56). Assim, quando essas nanopartículas são oxidadas em meio alcalino, a formação do óxido catalítico seguido pela adsorção da molécula a ser oxidada na superfície do eletrodo contribui de maneira eficiente para que ocorra a sua oxidação.

Assim, foi realizada a formação de nanopartículas de ouro em RGO-GCE seguida pela formação do óxido catalítico. Os parâmetros para a eletrodeposição das nanopartículas de ouro foram estudados a fim de obter partículas uniformemente distribuídas sobre as folhas RGO e em tamanhos menores que 100 nm.

Os parâmetros que afetam o tamanho e a forma das nanopartículas durante a eletrodeposição são: tempo de acúmulo, concentração da solução contendo o íon metálico e o potencial aplicado. Assim, o RGO-GCE foi colocado em solução de  $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ AuCl}_4^-$  em meio de  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e um potencial constante foi aplicado por um tempo determinado. Após isso, o eletrodo foi colocado em solução de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH para formação do óxido e do hidróxido de ouro, realizado por CV na faixa de potencial de - 0,30 a

0,50 V até estabilização da corrente, que ocorreu após 20 ciclos. Para analisar as melhores condições na formação das AuNP, foi feita oxidação de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de D-manitol por CV em meio de NaOH  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  na faixa de 0,0 a 1,5 V.

**Figura 12** - Voltamogramas cíclicos referente a oxidação de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de D-manitol em meio de NaOH  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  para (a) AuNP/RGO-GCE e para (b) RGO-GCE,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



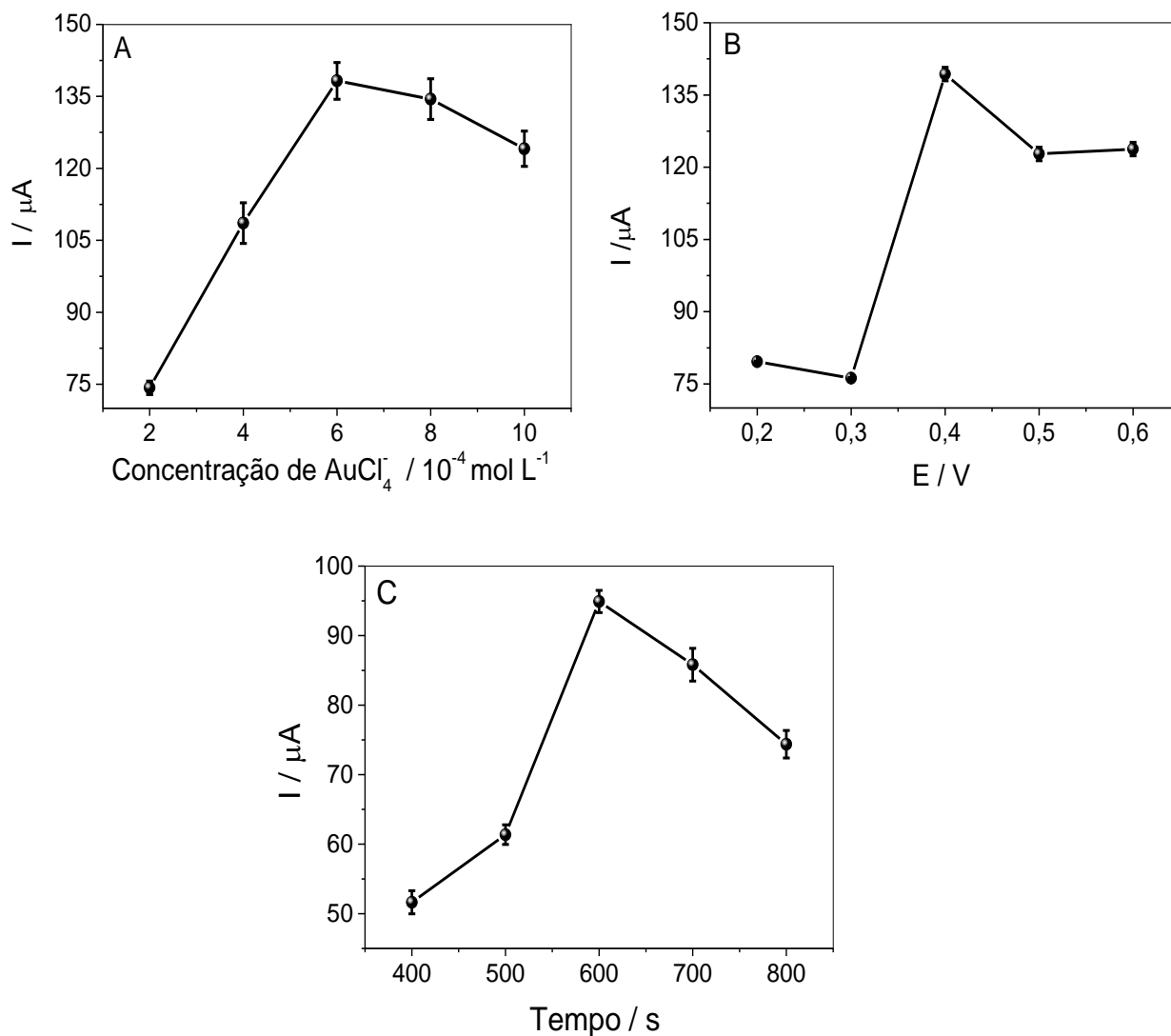
Fonte: elaborado pelo autor.

O primeiro parâmetro estudado foi a influência da concentração dos íons  $\text{AuCl}_4^-$  na eletrodeposição das nanopartículas. Como podemos observar na Figura 13 – A, o aumento da concentração de íons ouro contribuiu para o aumento da corrente de pico na oxidação do D-manitol até a concentração de  $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{AuCl}_4^-$ . Em concentrações iguais ou superiores a  $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  foi possível observar uma queda na corrente, indicando que a superfície do eletrodo se encontra saturada por ouro, levando a formação do filme. Assim foi escolhida a concentração de  $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{AuCl}_4^-$  para a deposição das AuNPs.

O potencial de eletrodeposição foi avaliado como mostra a Figura 13 – B. Com o aumento do potencial de eletrodeposição de 0,20 a 0,40 V a resposta na oxidação do D-manitol foi crescente e após 0,50 V a corrente decaiu, mantendo-se constante até 0,60 V, indicando que em potenciais acima de 0,40 V a deposição de ouro na superfície ocorreu mais lentamente. Assim, o potencial de 0,40 V foi o escolhido para a eletrodeposição das nanopartículas.

O tempo de eletrodeposição é um outro importante parâmetro para a modificação do eletrodo com nanopartículas, estando diretamente relacionado com a quantidade de metal depositado na superfície do eletrodo. O tempo foi estudado na faixa de 400 a 800 s, como mostra a Figura 13 – C. Observando o gráfico é possível notar uma maior corrente de pico para o tempo de 600 s, seguido de um decréscimo da corrente até 800 s. Essa diminuição da corrente de oxidação do D-manitol é provavelmente devido a aglomeração das nanopartículas depositadas na superfície do eletrodo, ocasionando a formação de filme e perda das propriedades nanoscópicas. Assim, o tempo de 600 s foi escolhido para dar continuidade aos estudos.

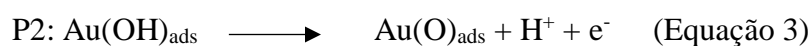
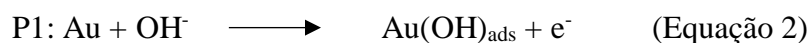
**Figura 13** - Parâmetros avaliados na formação de nanopartículas de ouro sobre a oxidação de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de D-manitol em meio de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH, sendo: (A) Efeito da concentração de  $\text{AuCl}_4^-$ , (B) Efeito do potencial e (C) tempo de eletrodeposição.



Fonte: elaborado pelo autor.

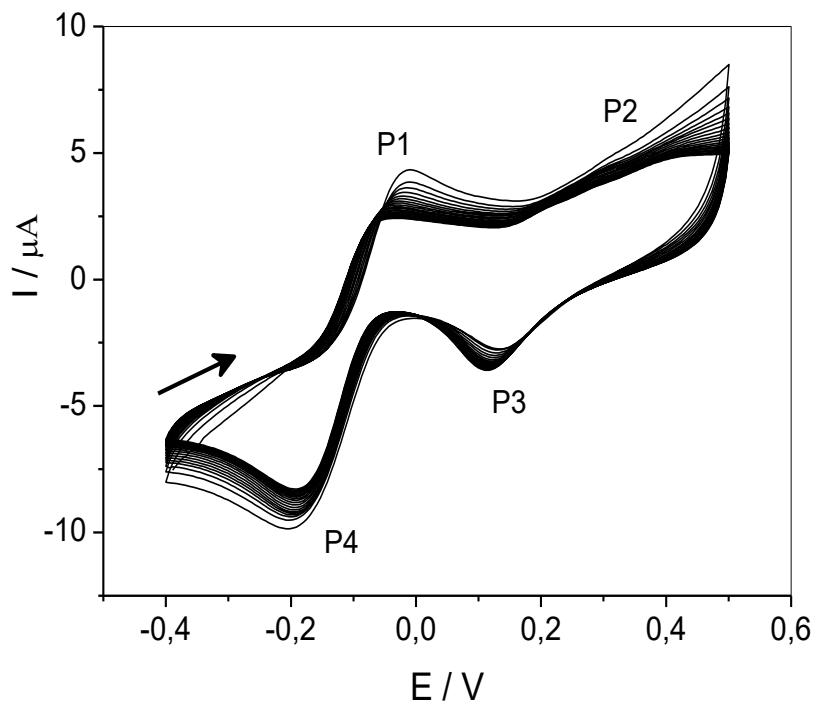
Uma vez que o ouro metálico demonstrou ser insatisfatório para a oxidação de muitos compostos orgânicos devido a sua fraca propriedade de quimiosorção, após a formação do ouro metálico sobre RGO-GCE, o eletrodo foi imerso em solução de 0,10 mol L<sup>-1</sup> de NaOH e submetido a sucessivos voltamogramas cíclicos, na faixa de potencial de -0,4 a + 0,5 V, para a formação do AuOH, que desempenha um papel fundamental nos mecanismos eletrocatalíticos em soluções alcalinas (90, 91).

A formação de AuOH pode ser vista através do voltamograma da Figura 14. Os quatro picos observados podem ser descritos como: o pico anódico P1 em -0,05 V, relacionado com a adsorção de íons hidroxila na superfície das nanopartículas de ouro (Equação 2) e o pico P2 correspondente a região de formação do óxido de ouro, devido à perda de um próton para a solução em um potencial aproximado de 0,40 V, em que AuOH é oxidado para AuO como descrito na Equação 3:



Na presença de oxigênio dissolvido, os picos catódicos que aparecem durante a varredura negativa correspondente a redução do AuO (pico P3) e a redução de O<sub>2</sub> (pico P4), que desaparece por desaeração da solução com N<sub>2</sub> (55).

**Figura 14** - Sucessivos voltamogramas cíclicos do eletrodo AuNP/RGO-GCE em solução de 0,10 mol L<sup>-1</sup> de NaOH,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



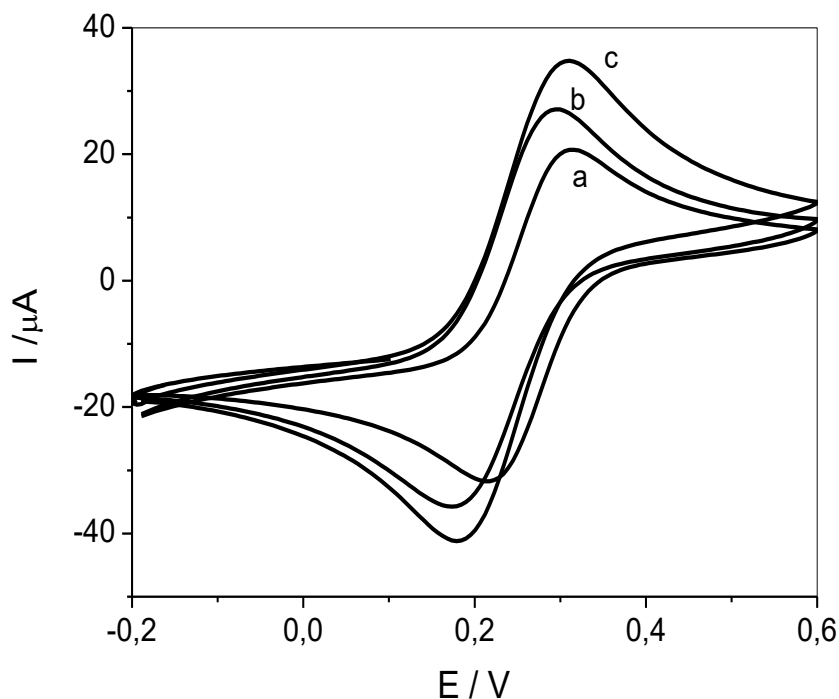
Fonte: elaborado pelo autor.

O mecanismo de oxidação dos polióis sobre a superfície modificada em meio alcalino, ocorre devido da interação entre a molécula e as espécies OH<sup>-</sup> adsorvidas sobre a superfície eletródica, como mostra a Equação 4 a seguir.



Os resultados voltamétricos da modificação do GCE para formação do AuNP/RGO-GCE são mostradas na Figura 15. O aumento da corrente anódica e catódica da sonda redox Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> observado após o eletrodo de RGO (curva b) ser modificado com AuNP (curva c), está relacionado com o aumento da área superficial causado pela presença das nanopartículas na superfície do RGO, facilitando a transferência de elétrons e proporcionando ao eletrodo maior sensibilidade.

**Figura 15** - CV para (a) GCE, (b) RGO-GCE, (c) AuNP/RGO-GCE em solução contendo  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> em 0,10 mol L<sup>-1</sup> KCl,  $v = 50$  mV s<sup>-1</sup>.



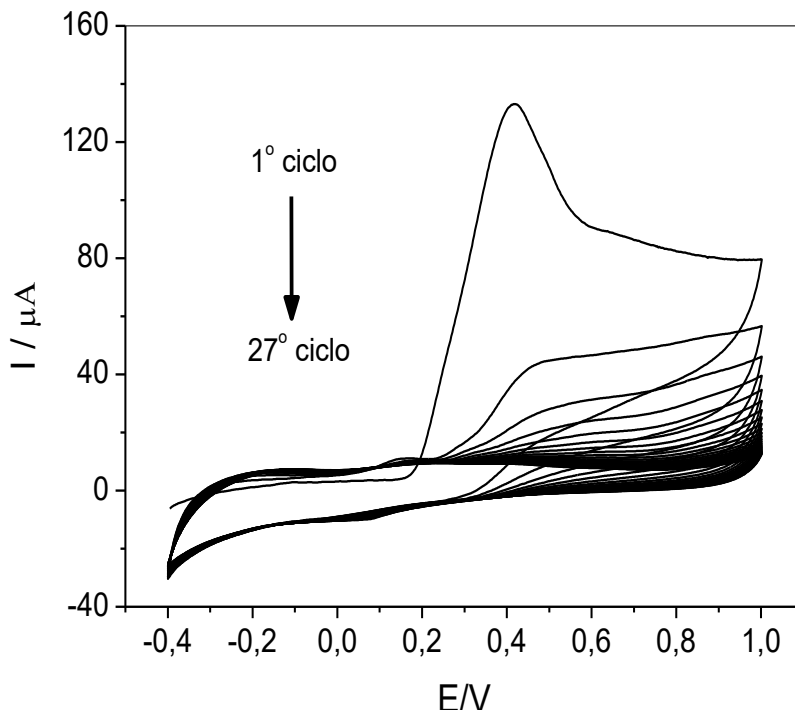
Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.2.2 Eletropolimerização de o-PD em AuNP/RGO-GCE para detecção de D-manitol

Após o preparo do AuNP/RGO-GCE, este foi utilizado como substrato para a eletropolimerização da o-PD por CV, entre os potenciais de -0,40 a 1,0 V na velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> por 27 ciclos. A solução para a eletropolimerização foi feita em meio de 0,10 mol L<sup>-1</sup> de tampão acetato pH 5,0 contendo  $5,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de *o*-fenilenodiamina e  $3,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de D-manitol. A Figura 16 mostra os 27 ciclos da eletropolimerização, e a Figura 17, o mecanismo da eletropolimerização. Analisando a figura, podemos observar no primeiro ciclo um pico anódico irreversível no potencial de 0,40 V, atribuído a oxidação do monômero para seu estado dímero. Nos ciclos subsequentes ocorre uma queda da corrente neste potencial devido a formação de uma película não-condutora na superfície do eletrodo. Durante a eletropolimerização, as moléculas de D-manitol presentes na solução são presas na matriz polimérica devido a capacidade dessas moléculas em interagir com as unidades de o-PD. A representação esquemática da impressão molecular é mostrada na Figura 18. Durante o processo de eletropolimerização a ligação de hidrogênio pode ocorrer entre o hidrogênio do

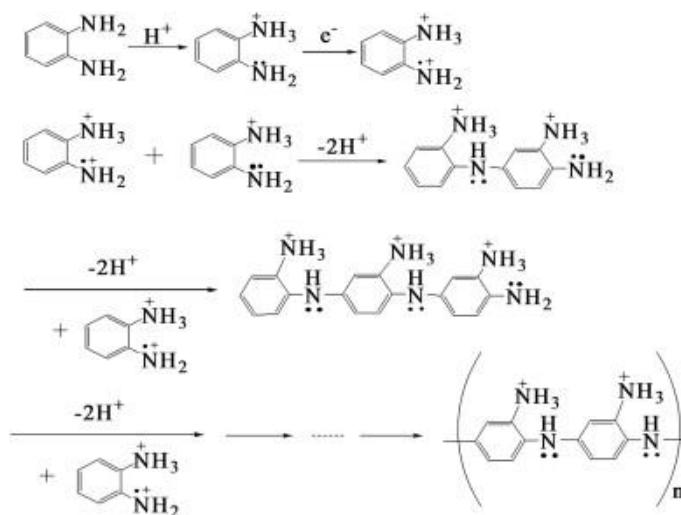
grupo hidroxila da estrutura do D-manitol com o átomo de nitrogênio do grupo N-H das unidades de o-PD, gerando uma matriz tridimensional contendo a molécula de interesse.

**Figura 16** - Eletropolimerização de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de *o*-fenilenodiamina em eletrodo de AuNP/RGO-GCE em solução tampão acetato pH 4,8 contendo  $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de D-manitol,  $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: elaborado pelo autor

**Figura 17** - Mecanismo da eletropolimerização da *o*-PD.



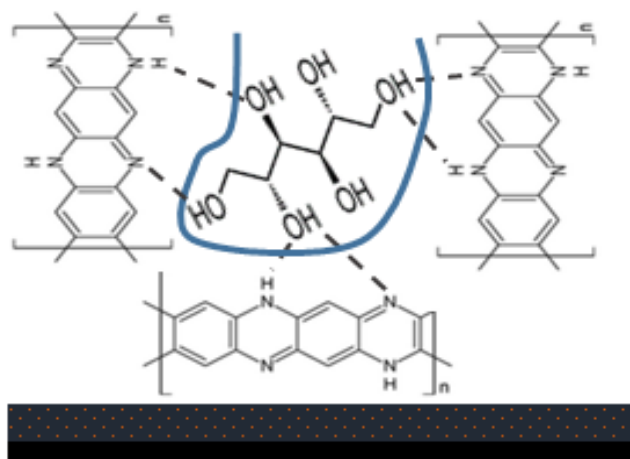
Fonte: Losito, et al. (92).

Não foi observada nenhuma diferença significativa entre a eletropolimerização na presença e na ausência das moléculas de D-manitol, o que pode ser explicado pelo fato destas moléculas necessitarem de um meio básico para sofrerem oxidação, porém este meio prejudicaria a eletropolimerização realizada na superfície do eletrodo. A melhor eletroatividade do polímero ocorre em meio ácido ou neutro, pois a presença de grupos NH<sub>2</sub> neutros ou protonados são os responsáveis pelas interações com a molécula molde (92).

Após a formação do MIP sobre AuNP/RGO-GCE, a molécula de D-manitol foi removida da matriz polimérica utilizando uma mistura de solventes orgânicos. O processo de remoção é um dos mais importantes na formação do MIP, pois cria um microambiente para o reconhecimento da molécula com base no posicionamento e no tamanho dos grupos funcionais.

Com a formação das cavidades, o reconhecimento é realizado por meio da religação da molécula. A obtenção do sinal analítico pode ser realizada no modo direto, quando a molécula é eletroativa nas condições de operação do MIP e o sinal é diretamente proporcional a sua oxidação e/ou redução na superfície do eletrodo. Outro método de realizar a detecção é no modo indireto, quando é necessário o uso de uma sonda redox para monitorar o processo de religação da molécula devido a sua impossibilidade de oxidação e/ou redução. No caso da molécula de D-manitol, a determinação foi realizada no modo indireto, devido a diferença do pH para o adequado funcionamento do MIP e para a oxidação do D-manitol. No método indireto de detecção, o par redox Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-/3-</sup> foi utilizado como o mediador entre o eletrodo impresso e a solução contendo D-manitol, por possuir boa estabilidade eletroquímica e por garantir resultados analíticos confiáveis (93). Quando o eletrodo impresso é imerso em solução contendo moléculas de D-manitol, as cavidades específicas formadas na superfície do eletrodo são parcialmente ocupadas devido a religação da molécula nas suas cavidades correspondentes, ocasionando à queda de corrente da sonda redox, pois há menos cavidades disponíveis por onde a sonda possa atingir a superfície do eletrodo. Quanto maior a concentração de D-manitol religada nas cavidades, menor será a corrente observada para o Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-/3-</sup>, pois um número menor de cavidades livres estarão disponíveis.

**Figura 18** - Representação da impressão de D-manitol em o-PD no eletrodo de AuNP/RGO-GCE.

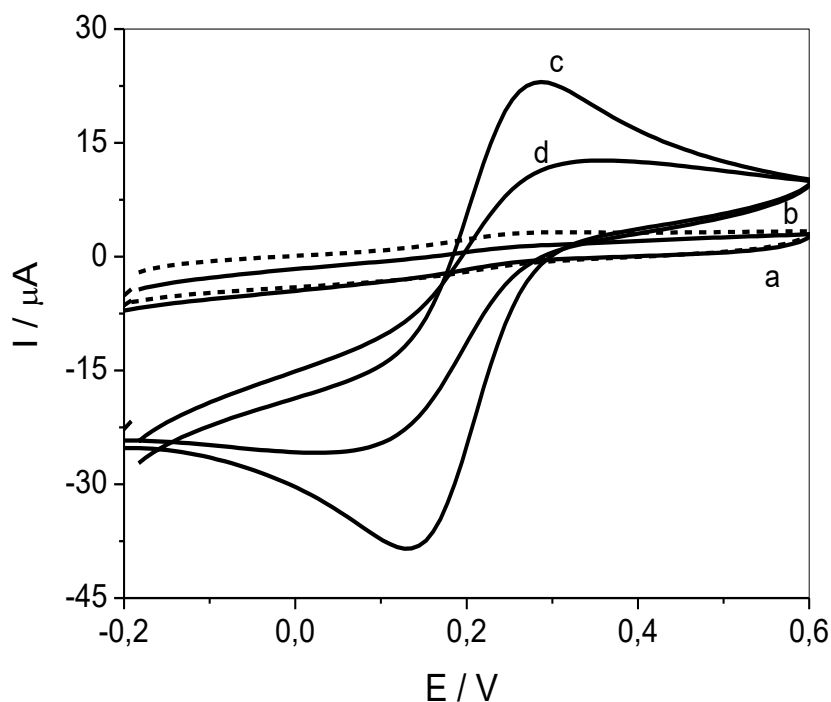


Fonte: elaborado pelo autor.

Para monitorar o comportamento eletroquímico em cada etapa da modificação do eletrodo na formação do MIP/AuNP/RGO-GCE, a técnica de voltametria cíclica foi utilizada como mostra a Figura 19. Após a eletropolimerização, nenhum pico foi observado no voltamograma, tanto na presença (curva a) quanto na ausência (curva b) da molécula de D-manitol. A ausência de corrente deve-se ao fato do filme de o-PD não ser condutor, além disso, trata-se de um filme muito compacto, assim não há canais disponíveis capazes de permitir que a sonda redox possa atingir a superfície do eletrodo. Com a remoção das moléculas de D-manitol, utilizando acetonitrila - ácido acético na proporção 5:2 (v/v), ocorreu a ruptura das ligações de hidrogênio entre o polímero e as moléculas, ocasionando a formação de cavidades na superfície do MIP. Essas cavidades tornam-se canais por onde os íons da sonda são capazes de atravessar e atingir a superfície do AuNP/RGO-GCE, e assim um par de picos redox (curva c) pode ser observado.

Após a formação das cavidades, o eletrodo foi colocado em solução contendo  $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de D-manitol em meio de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  PBS (pH 6,5) durante 15 minutos sob agitação de  $\sim 50 \text{ rpm}$ , com o objetivo de que as moléculas se religassem nas suas cavidades complementares. Após esse período, o eletrodo foi retirado da solução, enxaguado em PBS pH 6,5 e colocado na solução contendo a sonda redox. Foi então verificado que a corrente de pico diminuiu (curva d), sugerindo que algumas cavidades foram preenchidas com D-manitol, bloqueando a chegada da sonda à superfície do eletrodo e assim, confirmando a existência de locais impressos específicos na matriz polimérica.

**Figura 19** - CV para (a) MIP (b) NIP (c) MIP após remoção da molécula de D-manitol e (d) MIP após a ligação de  $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de D-manitol, em solução contendo  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$  em KCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .



Fonte: Beluomini et al. (79).

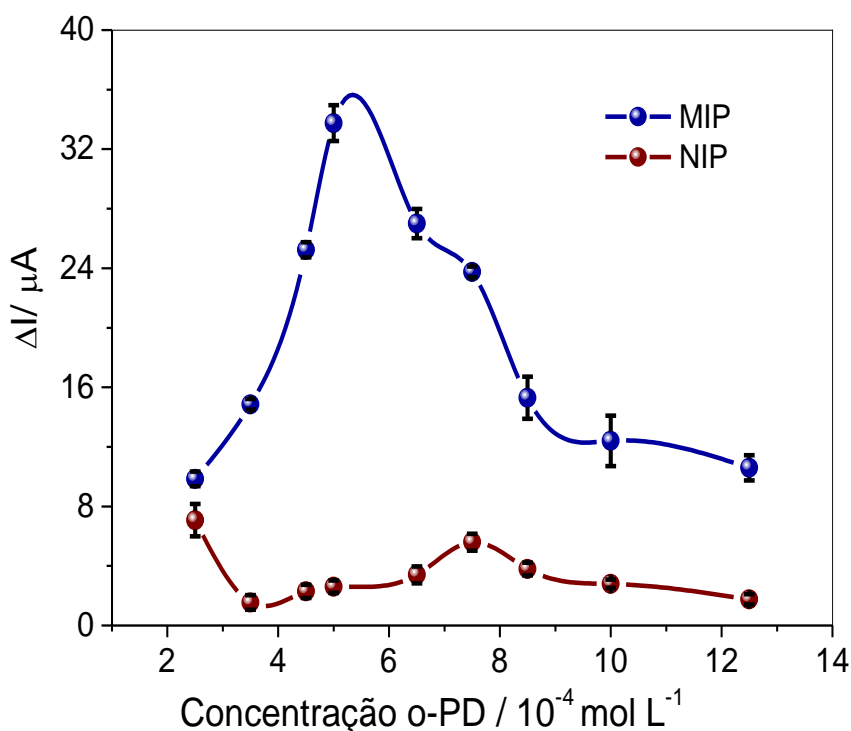
#### 4.2.3 Estudo dos parâmetros que influenciam a formação do MIP/AuNP/RGO-GCE

Para o sucesso no desenvolvimento de um sensor de reconhecimento molecular, o estudo dos parâmetros experimentais que interferem na sua performance é de extrema importância. O comportamento do MIP é influenciado pelas condições no qual ocorre a eletropolimerização do monômero juntamente com a molécula molde, o pH da solução, duração da eletropolimerização e as condições para a extração e religação da molécula de interesse nas cavidades formadas. Todos esses parâmetros estão diretamente relacionados com a espessura, estabilidade química e física do filme e também com a qualidade das cavidades formadas. Para a escolha da melhor condição de formação do MIP, foi utilizada a voltametria de pulso diferencial (DPV). A variação da corrente de pico ( $\Delta I$ ), na oxidação da sonda redox, antes e após a religação da molécula de D-manitol nas cavidades formadas, foi utilizada para avaliar quais as melhores condições de cada parâmetro estudado.

#### 4.2.3.1 Efeito da concentração de o-fenilenodiamina

A concentração do monômero durante a eletropolimerização desempenha um papel importante na construção do MIP pois influencia diretamente na espessura do filme, na quantidade de moléculas impressas e na sensibilidade. A fim de estudar o efeito da concentração de o-PD na resposta do sensor, as concentrações entre  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  a  $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foram avaliadas, como mostrado na Figura 20. Analisando está figura é possível observar que em concentrações inferiores a  $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de o-PD, a diferença de resposta para o MIP e para o NIP é muito pequena, provavelmente devido ao pequeno número de moléculas impressas durante o processo de eletropolimerização. Com isso, a diferença de resposta entre o eletrodo impresso e o não impresso foi mínima. No entanto, altas concentrações de o-PD são susceptíveis à menor sensibilidade da resposta eletroquímica devido a formação de filmes mais espessos. Assim, a concentração de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de o-PD foi escolhido visando obter maior sensibilidade.

**Figura 20** - Efeito da concentração de o-PD, durante a eletropolimerização com (MIP) e sem D-manitol (NIP), na resposta do sensor usando DPV na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.

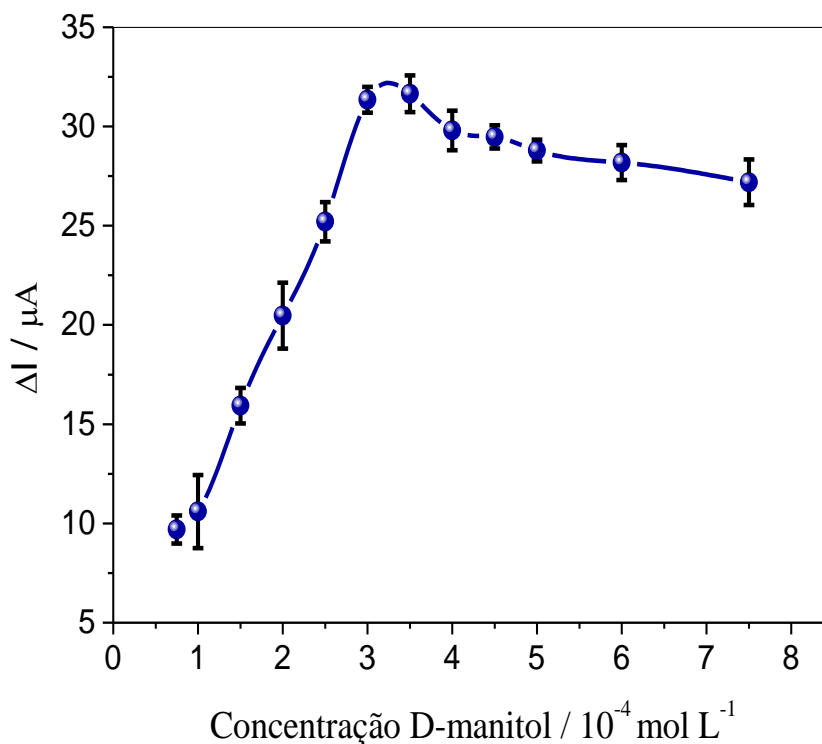


Fonte: adaptado de Beluomini et al. (79).

#### 4.2.3.2 Efeito da concentração de D-manitol

A concentração de D-manitol na solução de polimerização exerce forte influência sobre a quantidade de sítios impressos que estarão disponíveis para a religação da molécula. A Figura 21 mostra o efeito de diferentes concentrações de D-manitol,  $0,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  a  $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , durante o processo de eletropolimerização e sua influência na resposta da MIP. Foi observado um maior  $\Delta I$  quando a concentração da molécula foi de  $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Quando a quantidade de D-manitol foi abaixo deste valor a resposta do MIP diminui, como consequência do menor número de moléculas disponíveis para impressão, resultando em uma menor sensibilidade. Já o sensor preparado com grandes quantidades de D-manitol pode se tornar menos seletivo, devido a aglomeração das moléculas durante a eletropolimerização afetar na formação das cavidades, tornando-as maiores. Portanto, a concentração ótima de D-manitol foi de  $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

**Figura 21** - Efeito da concentração de D-manitol durante a eletropolimerização com o-PD. A resposta do MIP foi avaliada em DPV na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.

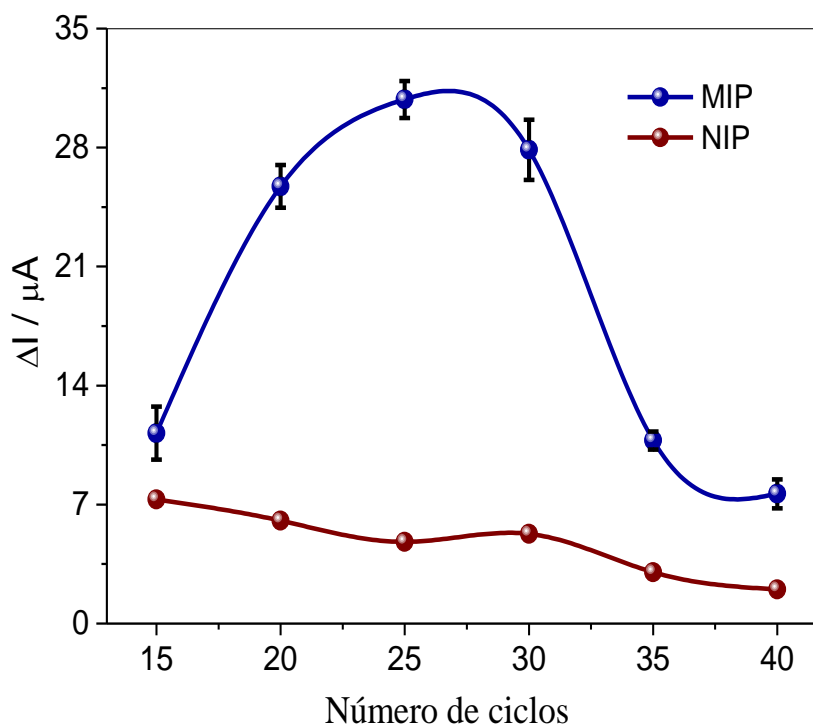


Fonte: adaptado de Beluomini et al. (79)

#### 4.2.3.3 Efeito do número de ciclos na eletropolimerização

O número de ciclos durante a eletropolimerização por CV afeta diretamente na sensibilidade do sensor, como pode ser observado na Figura 22. Uma diminuição considerável no desempenho do MIP ocorreu em ciclos inferiores a 20, provavelmente devido à baixa cobertura da superfície pelo polímero, resultando na formação de poucas cavidades. Acima de 30 ciclos uma extensa eletropolimerização ocorreu, resultando em um filme muito espesso sobre o eletrodo. Com isso, um maior obstáculo para a sonda redox atingir a superfície do eletrodo é imposto, dificultando a transferência de massa. Filmes impressos de maior espessura são inadequados quando se trata de acessibilidade, resultando em perda de sensibilidade do sensor. Assim, a melhor condição foi obtida através da aplicação de 27 ciclos.

**Figura 22-** Influência do número de ciclos durante a eletropolimerização de o-PD na presença (MIP) e na ausência (NIP) de D-manitol. A variação da resposta foi analisada por DPV na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl

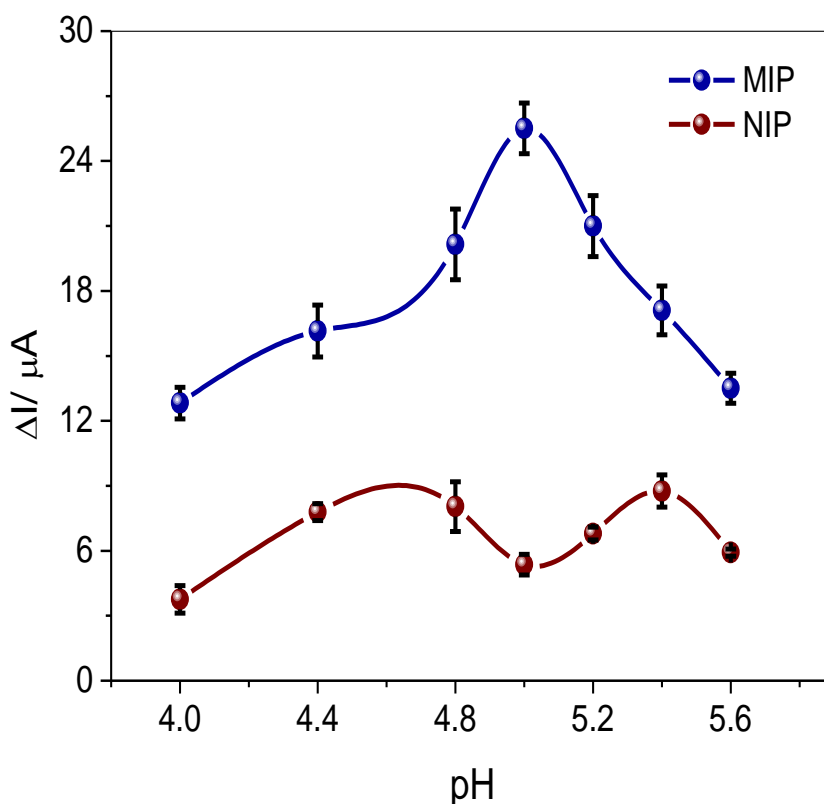


Fonte: adaptado de Beluomini et al. (79)

#### 4.2.3.4 Influência da concentração hidrogeniônica

A variação da concentração hidrogeniônica da solução de polimerização tem forte influência sobre a qualidade do filme formado sobre o eletrodo. A Figura 23 mostra a dependência da corrente de pico na faixa de pH de 4,0 a 5,6. Essa faixa de pH foi escolhida para o estudo pois em meio mais ácido os grupos aminos das unidades de o-PD são condensados com o anel benzeno adjacente ao longo da cadeia do polímero, embora ainda exista nesta estrutura grupos  $\text{NH}_2$  livres. Em pHs mais elevados a extensão da conjugação é diminuída progressivamente devido ao aumento dos grupos  $\text{NH}_2$  livres. A capacidade do o-PD em polimerizar e interagir com moléculas por meio de ligações de hidrogênio fica em torno de pH 5 a 7. Neste caso, a presença de  $\text{NH}_2$  neutras ou protonadas pode ser responsável pelas interações com as moléculas utilizadas como moldes moleculares. Assim, analisando os dados obtidos, a maior variação de corrente foi observada no pH 5,0 em que foi obtida a menor resposta para o eletrodo não-impresso (NIP) e maior para o impresso (MIP).

**Figura 23** - Influência do pH na eletropolimerização de o-PD na presença (MIP) e na ausência (NIP) de D-manitol. Variação da resposta foi realizada por DPV na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.

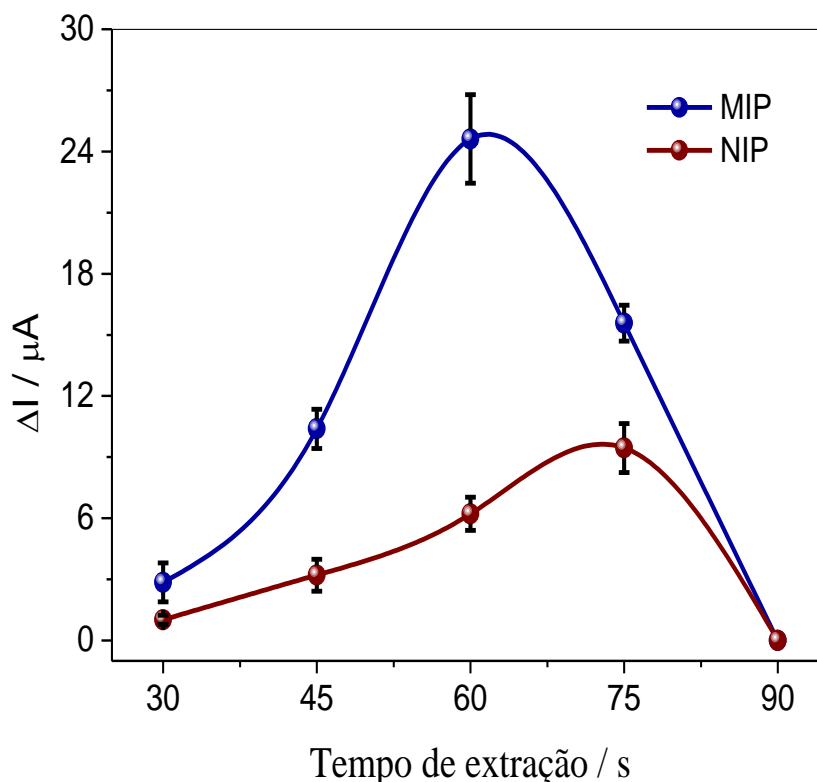


Fonte: Beluomini et al. (79).

#### 4.2.3.5 Efeito do tempo de extração da molécula de D-manitol

A grande vantagem na formação de cavidades impressas é o seu alto grau de especificidade. Para isso, as cavidades devem ter o mesmo tamanho, forma e posicionamento dos grupos funcionais, a fim de garantir, posteriormente, a religação. Assim, um dos parâmetros cruciais na formação do MIP é a remoção da molécula molde, que deve ser realizada de forma completa e sem danificar a rede polimérica. Vários solventes foram testados, em diferentes concentrações, entre eles: álcool, água ultra-pura, solução de NaOH, metanol/ácido acético, metanol/água, acetonitrila/água, etanol/água e acetonitrila/ácido acético. Os resultados indicaram que a solução de acetonitrila/ácido acético foi capaz de remover rápida e completamente a molécula de D-manitol da matriz polimérica, isso porque a mistura dos solventes é capaz de provocar o inchamento do polímero, enfraquecendo as ligações de hidrogênio e liberando a molécula molde. O tempo que o eletrodo deve ficar em contato com a solução também é muito importante, pois longos períodos de exposição podem danificar a formação das cavidades, devido ao inchamento excessivo do polímero. Para obter o melhor tempo de extração, a variação da corrente em diferentes tempos foi avaliada conforme mostra a Figura 24. O eletrodo foi mergulhado, sob suave agitação (~50 rpm), em solução contendo acetonitrila-ácido acético na proporção 5:1 (v/v). Como pode ser observado, a corrente do MIP aumentou rapidamente com o aumento do tempo de imersão, sugerindo a formação das cavidades por onde a sonda redox foi capaz de atingir a superfície do eletrodo, mas declinou gradualmente após 60 s. No tempo de 90 s o eletrodo não apresentou nenhuma corrente significativa, indicando que o inchamento do polímero não condutor, pode ter bloqueado toda a superfície eletroativa. Assim, o tempo de 60 s foi escolhido como o melhor tempo para remoção da molécula de D-manitol e formação das cavidades.

**Figura 24** - Efeito do tempo de extração do D-manitol na corrente de pico da resposta voltametria na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.

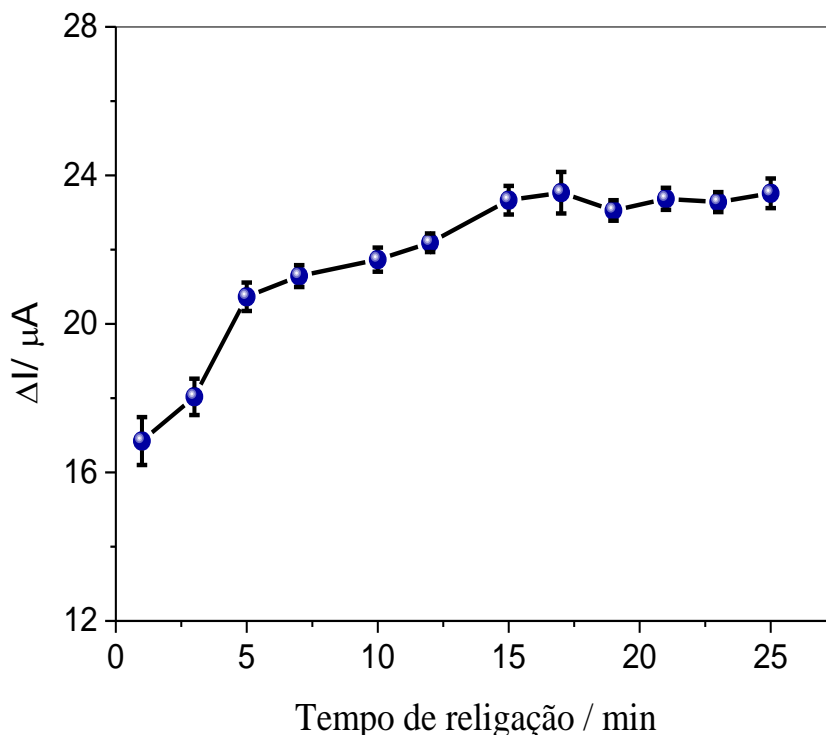


Fonte: adaptado de Beluomini et al. (79).

#### 4.2.3.6 Influência do tempo de religação da molécula de D-manitol

Após a extração da molécula, o eletrodo foi enxaguado delicadamente e a influência do tempo de religação da molécula nas cavidades formadas foi avaliada. Para isso, o eletrodo foi colocado em uma solução contendo  $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de D-manitol em PBS pH 6,5, com agitação de  $\sim 50 \text{ rpm}$ , durante um certo intervalo de tempo. Após isso, o eletrodo foi retirado da solução e a leitura foi realizada por DPV em  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em meio de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl. A Figura 25 mostra o efeito do tempo no reconhecimento molecular. Os resultados mostraram que houve um aumento na diferença de corrente a medida que o tempo de religação aumentou. Uma resposta estável foi obtida após 15 minutos, sugerindo que foi alcançado um equilíbrio na adsorção, sendo este selecionado para o desenvolvimento do sensor.

**Figura 25-** Efeito do tempo de religação na resposta do MIP através da resposta voltametria na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.



Fonte: adaptado de Beluomini et al. (79).

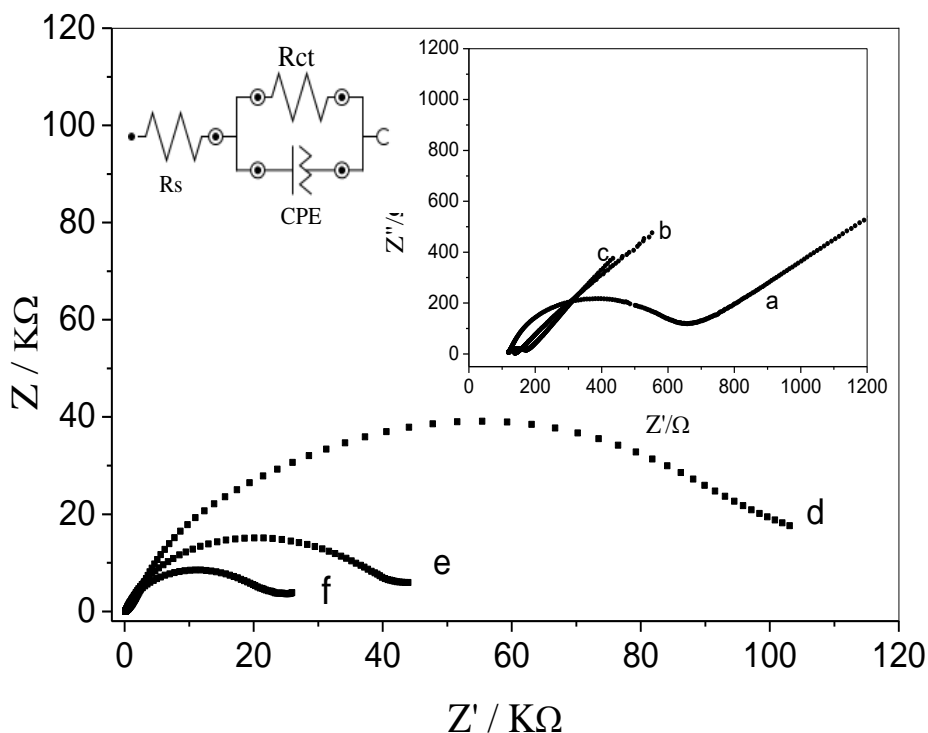
#### 4.2.4 Caracterização do MIP/AuNP/RGP-GCE

O sensor foi caracterizado eletricamente por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), quimicamente por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e morfologicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM), nas condições relatadas na parte experimental.

A EIS fornece uma visão completa e detalhada das características da interface eletrodo/solução. A resistência de transferência de elétrons foi investigada usando uma solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  como sonda redox e um típico arco de impedância (diagrama de Nyquist) foi obtido como mostra a Figura 26. O circuito compatível com o diagrama também é mostrado na figura. Neste circuito,  $R_s$  representa a resistência da solução, sendo o CPE o elemento de fase constante que está relacionado à capacitância de dupla camada e o  $R_{ct}$  se refere a resistência de transferência de carga. Os dados foram discutidos em termos de  $R_{ct}$  devido ao seu significado físico simples quando comparado aos outros elementos e por descrever a taxa de transferência de carga durante a reação eletrodica.

Na inserção superior direita da Figura 26, podemos observar o diagrama de Nyquist para (a) GCE, (b) RGO-GCE e (c) AuNP/RGO-GCE. Analisando o diagrama, notamos que um semicírculo bem definido foi obtido para CGE, com Rct de 547,0  $\Omega$ , para RGO-GCE a Rct foi de 76,7  $\Omega$  e de 25,0  $\Omega$  para AuNP/RGO-GCE. A diminuição da Rtc indica que as modificações facilitaram a transferência de elétrons, em concordância com os dados analisados por CV. Com a formação do MIP sobre a superfície modificada do eletrodo, um aumento no Rct foi observado (curva d) e pode ser uma consequência da formação do filme, compacto e não condutor, de o-PD na superfície do eletrodo. Na curva f, o Rct sofreu uma redução notável após a remoção das moléculas de D-manitol da matriz polimérica, sugerindo que a formação das cavidades foi bem sucedida e que canais foram abertos, possibilitando a sonda redox de atingir a superfície condutora de AuNP/RGO-GCE. Na curva e, um aumento do Rct foi observado, podendo ser atribuído à religação da molécula de D-manitol nas cavidades impressas, bloqueando a chegada da sonda até a superfície do eletrodo.

**Figura 26** - Diagrama de Nyquist para diferentes eletrodos (a) GCE (b) RGO-GCE (c) AuNP/RGO-GCE (d) MIP/AuNP/RGO-GCE antes da extração de D-manitol (e) MIP/ AuNP/RGO-GCE após religação de D-manitol (f) MIP/AuNP/RGO-GCE após a extração de D-manitol. Solução para análise de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl e a faixa de frequência foi de 0,01 Hz a 100 kHz.

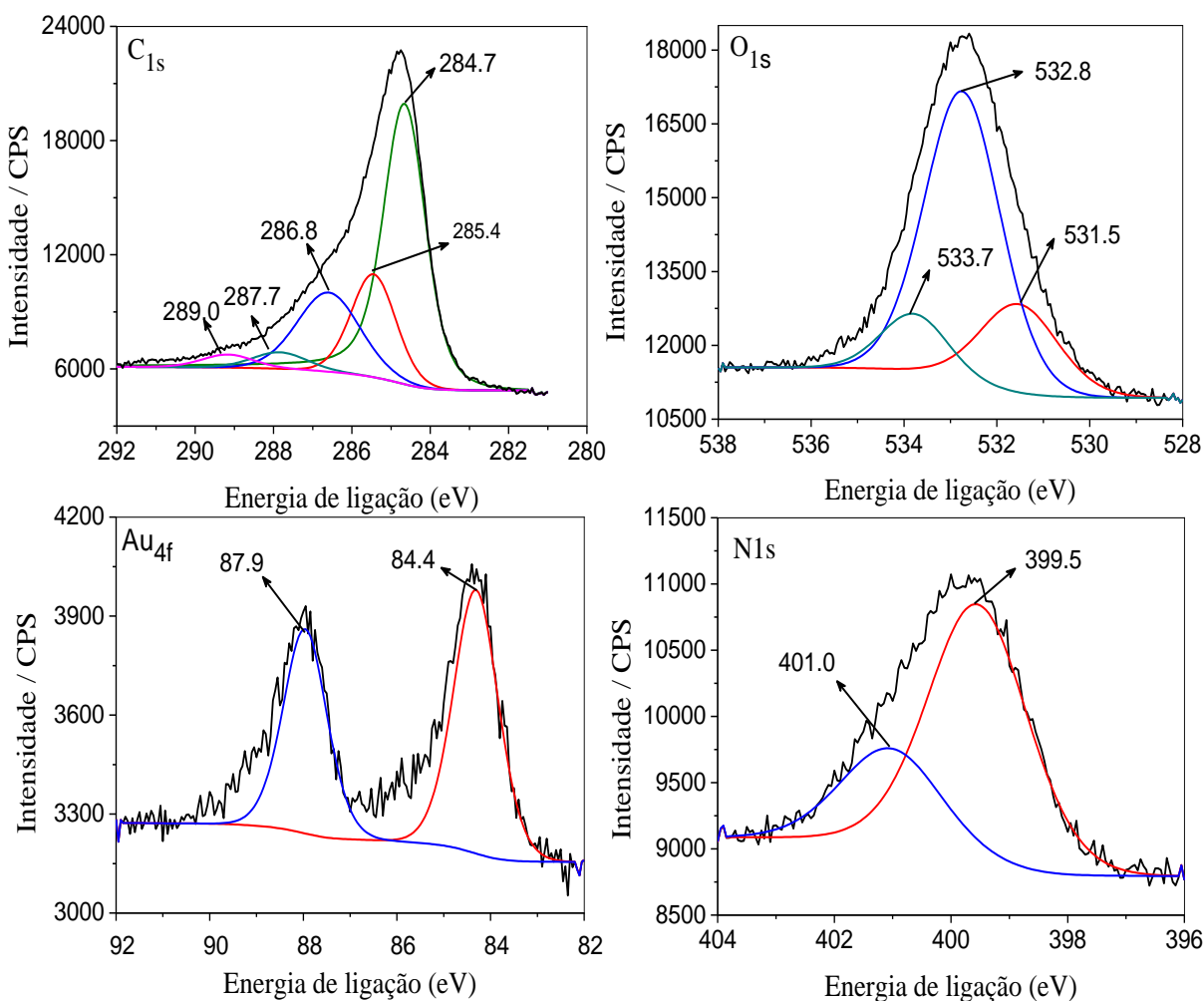


Fonte: Beluomini et al. (79).

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X é uma das técnicas de análise de superfície mais utilizadas para a caracterização de materiais. Nesta técnica a distribuição de energia cinética dos fotoelétrons consiste de picos discretos relacionados aos níveis dos elétrons do átomo fotoionizado. A energia de ligação de um elétron pode ser obtida diretamente pela medida da sua energia cinética, uma vez que a energia dos fótons incidentes é conhecida. A identificação dos elementos presentes na superfície é feita pela energia de ligação dos fotoelétrons. A intensidade (área integrada sob o pico fotoelétrico) é proporcional à quantidade dos átomos no volume de amostra analisado, permitindo assim, a análise semiquantitativa da superfície (94).

Assim, a composição química do MIP/AuNP/RGO-GCE foi investigada usando XPS através da deconvolução dos espectros de alta resolução do C1s, O1s, N1s e Au4f presentes na amostra, como mostra a Figura 27.

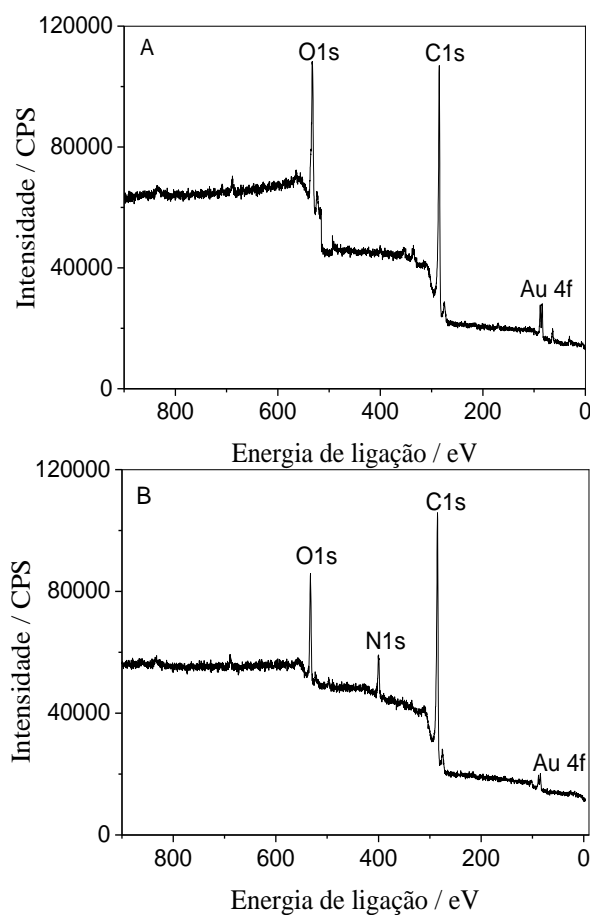
**Figura 27** - Espectros de XPS para C 1s , O 1s, Au4F e N1s



Fonte: adaptado de Beluomini et al. (79).

Os espectros de C1s podem ser deconvoluídos em cinco componentes correspondentes aos átomos de carbono presentes em diferentes grupos funcionais com energias de ligação, BE (do inglês *binding energy*), de 284,7 eV relativo ao grupo C-H, 285,4 eV ao C-N, 286,8 eV ao C-O, 287,7 eV ao C=O e 289,0 eV ao grupo O-C=O [29]. O conteúdo relativo ao oxigênio foi monitorado pelo sinal de O1s. Os espectros de O1s de alta resolução da amostra podem ser deconvoluídos em três componentes correspondentes aos átomos de oxigênio presentes em diferentes grupos funcionais sendo a energia de ligação de 531,5 (C=O), 532,8 (C-O) e 533,7 (O-C=O) eV, comprovando que o eletrodo foi funcionalizado com RGO. O pico do espectro do Au4f a 83,1 eV confirma a presença de Au na superfície do sensor. O sinal em 87,9 eV pode ser atribuído às nanopartículas de ouro que não sofreram reação elétrica. O espectro de XPS de N1s foi deconvoluído em dois componentes. O pico observado a 399,5 eV corresponde aos grupos N-H da amina enquanto o grupo N-H livre é observado em 401,0 eV [34].

**Figura 28** - Amplo espectro de XPS para (A) AuNP/RGO-GCE e (B) MIP/AuNP-RGO-GCE.

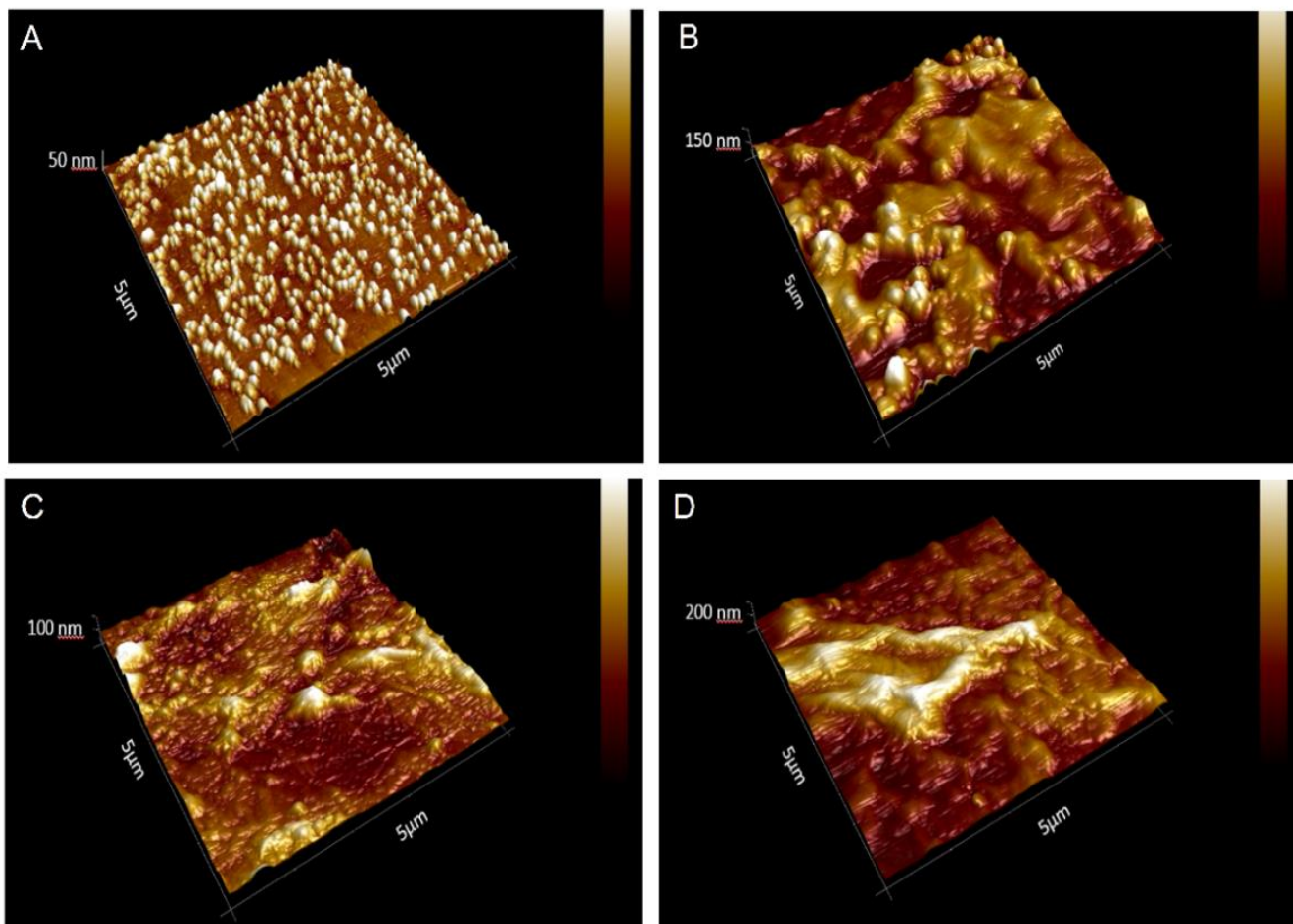


Fonte: adaptado de Beluomini et al. (79)

O amplo espectro de XPS também foi obtido a fim de comparar o AuNP/RGO-GCE (Figura 28-A) e MIP/AuNP/RGO-GCE (Figura 28-B). Analisando os dois espectros, podemos observar o sinal de N1s em B, confirmando a modificação do eletrodo com o-PD.

A análise morfológica da superfície do sensor foi investigada por AFM e MEV. A análise por AFM 3D é mostrada na Figura 29. Na Figura 29-A, podemos observar que o eletrodo foi homogeneamente modificado por AuNP, com diâmetro médio de 80 nm e altura de 40 nm. A superfície apresentou uma rugosidade de 16,6 nm, expressa em termos de raiz quadrática média (RMS), em que RMS é proporcional à aspereza. Uma alteração na rugosidade é evidente quando o eletrodo é modificado com o filme polimérico durante o processo de impressão molecular. Os valores RMS obtidos foram de 52,4 nm para MIP antes da remoção da molécula de D-manitol (Figura 29-B) e 23,7 nm para MIP após a retirada da molécula (Figura 29-C). Esta diferença na rugosidade mostra que a eletrodeposição de o-PD seguida pela remoção de D-manitol, foram realizadas com sucesso. O valor de RMS para o NIP foi de 19,6 nm (Figura 29-D), confirmando que o filme depositado foi relativamente plano e compacto.

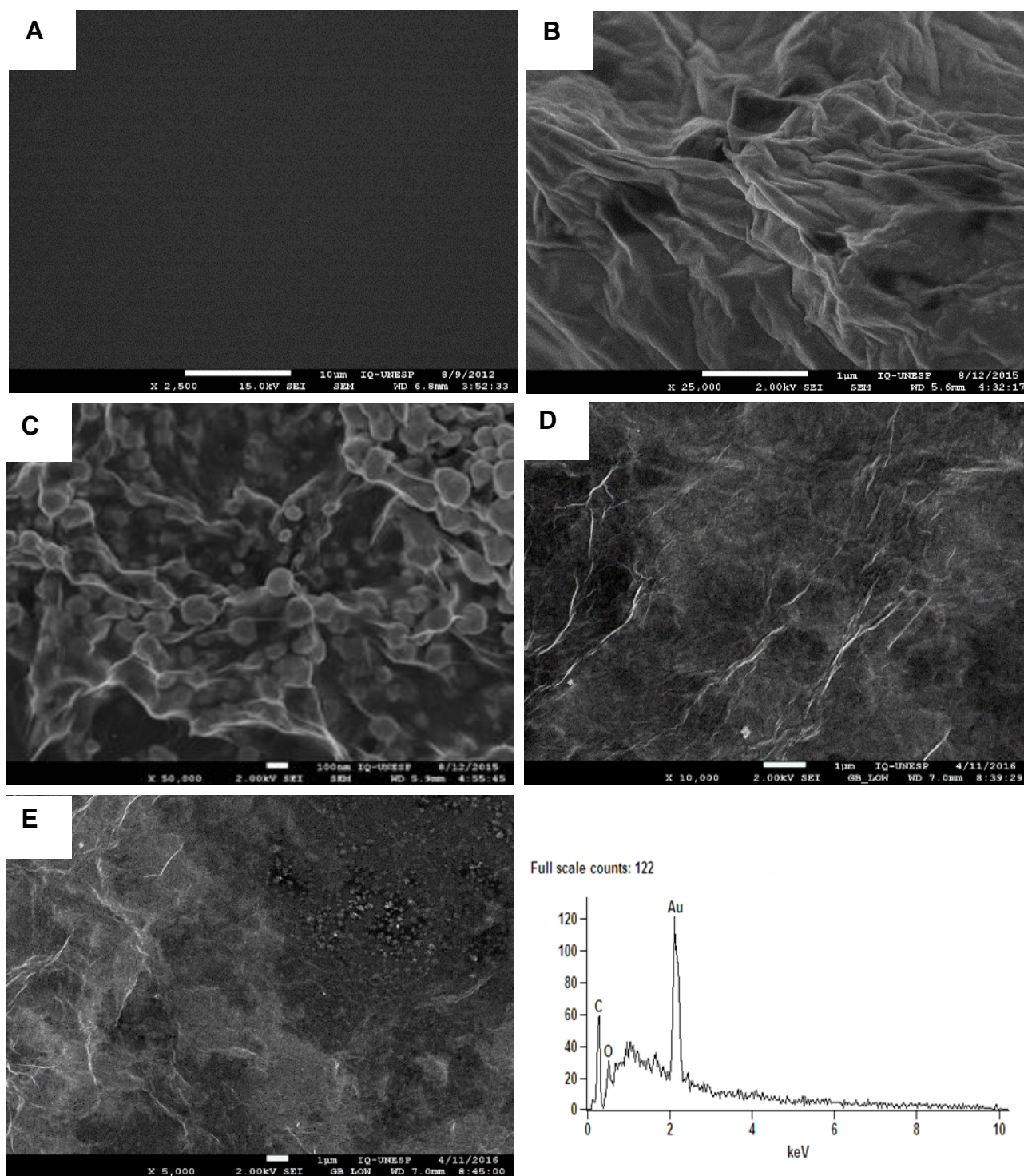
**Figura 29** – Imagens de AFM para (A) eletrodo AuNP/RGO-GCE, (B) MIP antes da remoção de D-manitol, (C) MIP após a remoção do modelo e (D) NIP.



Fonte: Beluomini et al. (79).

A morfologia dos eletrodos também foi avaliada por imagens de MEV e sua composição por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS). A Figura 30 – A se refere ao GCE sem modificação. A Figura 30-B mostra a superfície do GCE coberto por nanofolhas de RGO dispersas homogeneamente sobre toda a superfície. A Figura 30-C mostra que o RGO-GCE envolve as nanopartículas de ouro eletrodepositadas sobre sua superfície. As AuNPs apresentaram diâmetro médio de  $58 \pm 10$  nm e o espectro de EDS (Figura 30 – F) confirma a presença de ouro no eletrodo. Nas Figuras 30 – D e 30 – E, mostram a formação do MIP sobre o eletrodo modificado, sendo possível observar a formação de um filme fino sobre a superfície, que se tornou relativamente mais rugosa.

**Figura 30** - Imagens de MEV para (A) GCE, (B) RGO-GCE, (C) AuNP/RGO-GCE, (D) MIP/AuNP/RGO-GCE antes da remoção de D-manitol (E) MIP/AuNP/RGO-GCE após remoção do D-manitol (F) Espectro de EDX para AuNP/RGO-GCE.

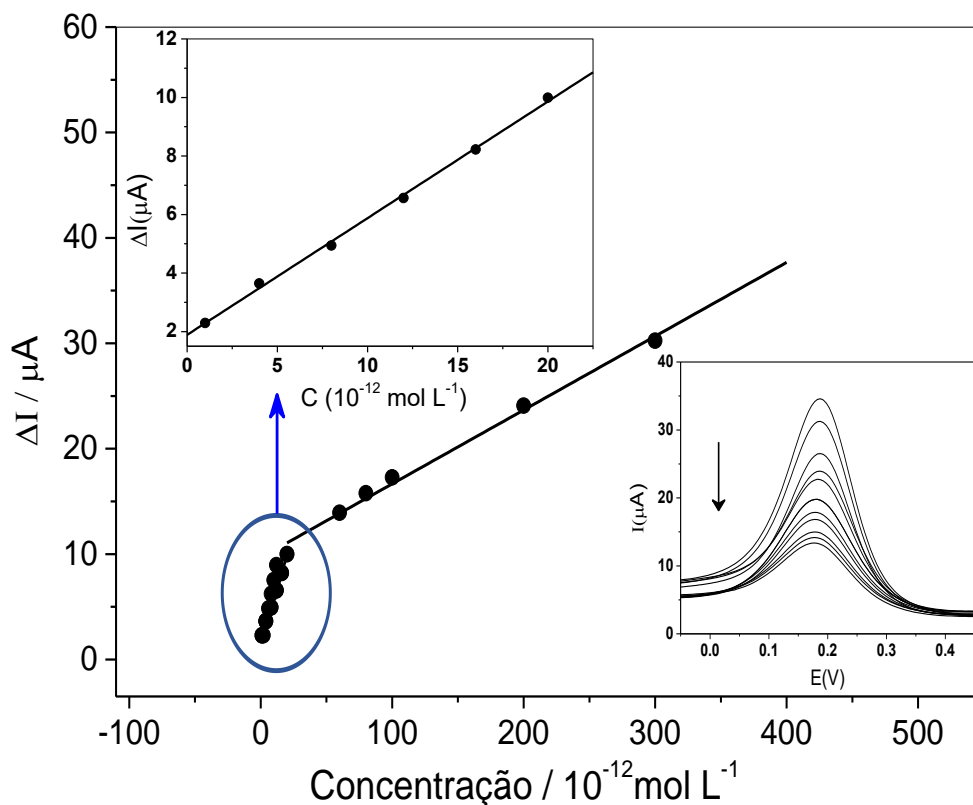


Fonte: adaptado de Beluomini et al. (79).

#### 4.2.5 Desempenho analítico do MIP/AuNP/RGO-GCE

Após a preparação e caracterização do sensor eletroquímico sob as condições otimizadas, curvas analíticas foram construídas para avaliar o desempenho do sensor. A Figura 31 mostra a resposta do MIP/AuNP/RGO-GCE utilizando a técnica de DPV em meio de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl após religação com moléculas de D-manitol em diferentes concentrações. Foi observado que a corrente de pico diminuiu à medida que a concentração de D-manitol aumenta, devido a ocupação das cavidades pelas moléculas. Por conseguinte, a redução no  $\Delta I$  foi proporcional à concentração de D-manitol em dois intervalos lineares:  $1,0 \times 10^{-12}$  a  $2,0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2,0 \times 10^{-11}$  a  $3,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ . O primeiro intervalo linear foi utilizado para obter as figuras de mérito. A equação de regressão linear foi  $\Delta I (\mu\text{A}) = 3,9 \times 10^{10} C_{\text{D-manitol}} + 0,20$  com um coeficiente de correlação de 0,998, com LD de  $7,7 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ , LQ de  $2,6 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$  e sensibilidade amperométrica (Sa) de  $3,9 \times 10^{10} \mu\text{A L mol}^{-1}$ , ( $n = 3$ ).

**Figura 31** - Curva de calibração para a detecção de D-manitol usando MIP/AuNP/RGO-GCE em  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$  após 15 min de religação em PBS pH 6,5. A curva apresentada na inserção superior esquerda foi obtida com a concentração de D-manitol na faixa de  $1,0 \times 10^{-12}$  a  $2,0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ . Os voltamogramas de DPV correspondentes com a concentração de D-manitol na faixa de  $1,0 \times 10^{-12}$  a  $3,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  estão na inserção inferior esquerda.



Fonte: adaptado de Beluomini et al.(79).

A Tabela 3 mostra um comparativo entre os eletrodos presentes na literatura para a determinação de D-manitol com os resultados obtidos neste estudo para o MIP/AuNP/RGO-GCE. Como podemos observar, o sensor proposto neste trabalho, exibe um menor limite de detecção.

A presença de duas faixas lineares pode ser atribuída aos diferentes níveis de afinidade entre os sítios impressos e as moléculas de D-manitol. Assim, quando o analito está presente em pequenas concentrações, há preferência pela ocupação os locais impressos de elevada afinidade, localizados na superfície do MIP. Os sítios impressos de menor afinidade, que residem mais profundamente na matriz polimérica, são ocupados quando há presença de maiores quantidades do analito, causando uma menor inclinação na reta da curva analítica.

**Tabela 3** - Comparação da faixa linear e LD para alguns métodos reportados para determinação eletroquímica de D-manitol.

Eletrodo	Faixa linear (mol L <sup>-1</sup> )	LD (mol L <sup>-1</sup> )	Referência
Au	$3,8 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-7}$	(95)
G/CuNP/CPE <sup>a</sup>	$1,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-7}$	(96)
CNT-CuNP hybrid paste electrode <sup>b</sup>	$1,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-7}$	(97)
Cu <sub>2</sub> O-CCE <sup>c</sup>	$8,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^{-7}$	(34)
Ni-CME <sup>d</sup>	$5,4 \times 10^{-6} - 1,1 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-6}$	(98)
Au	$1,2 \times 10^{-8} - 1,1 \times 10^{-6}$	$5,1 \times 10^{-8}$	(99)
MIP/AuNP/RGO-GCE	$1,0 \times 10^{-12} - 1,2 \times 10^{-11}$	$7,7 \times 10^{-13}$	Este trabalho

a) nanopartículas de grafeno-cobre em eletrodo de pasta de carbono. b) CNT refere a nanotubos de carbono e CuNP refere a nanopartículas de cobre. c) CCE refere a eletrodos de compósitos de carbono. d) refere a eletrodos quimicamente modificados.

Fonte: adaptado de Beluomini et al. (79).

A repetibilidade foi avaliada na análise de  $5,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de D-manitol por três vezes sucessivas com o mesmo eletrodo modificado, obtendo um RSD de 1,9 %. A estabilidade do MIP foi medida durante 20 dias e após este período, o sensor ainda apresentava 87,3 % de sua corrente inicial, como mostra a Tabela 4.

**Tabela 4** - Estudo da estabilidade do MIP/AuNP/RGO-GCE.

Dia	$\Delta I / \mu A$
1°	28,8
7°	27,5
13°	26,0
20°	25,2

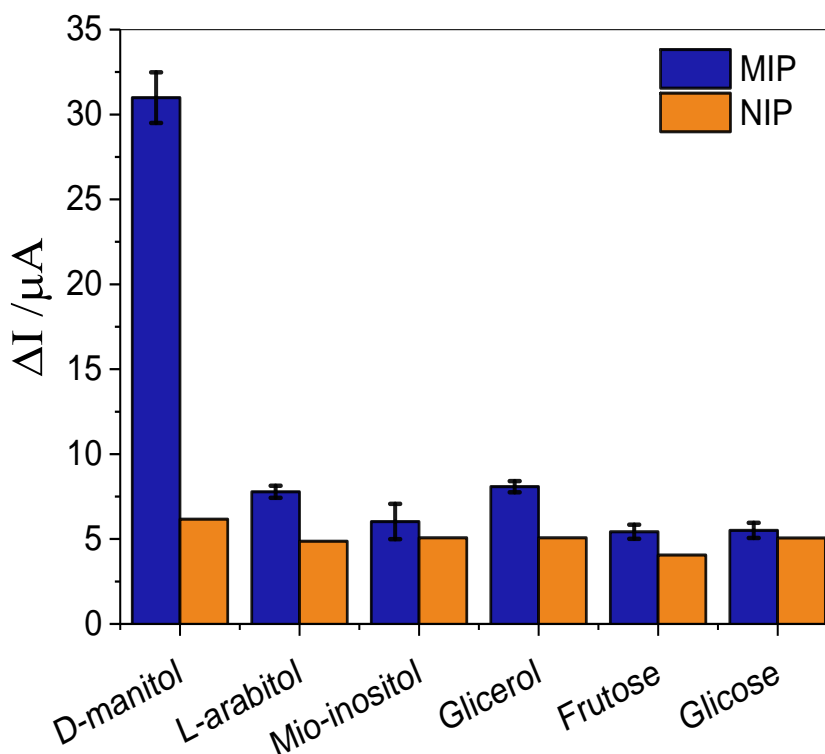
Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.2.6 Seletividade do MIP/AuNP/RGO-GCE para o D-manitol

O MIP deve apresentar elevada seletividade para a molécula molde. O reconhecimento específico é baseado na interação entre os grupos funcionais da molécula de interesse com os grupos funcionais dos sítios impressos. Há dois fatores que desempenham papéis fundamentais na seletividade: os grupos funcionais das moléculas e o seu tamanho. Moléculas que contém estrutura similar, apresentam maior efeito de interferência (93).

A seletividade do sensor desenvolvido para a molécula de D-manitol foi avaliada comparando a resposta voltamétrica da DPV após a religação do D-manitol e algumas possíveis moléculas interferentes. Os compostos presentes na vinhaça de cana-de-açúcar com estrutura semelhante ao D-manitol tais como, L-arabitol, Mio-inositol, glicerol, sacarose e glicose, foram avaliados. Para isso, a variação de corrente do  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  após o sensor ser colocado em solução contendo a molécula a ser analisada na concentração de  $5,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$  usando DPV é mostrada na Figura 32. Analisando a figura podemos observar que a molécula de L-arabitol e glicerol foram as que apresentaram uma pequena interferência, isso pode ser explicado pelo fato dessas moléculas serem menores que a molécula de D-manitol e com isso apresentarem uma maior acessibilidade aos locais de impressão. Moléculas maiores e com formas estruturais diferentes, são mais difíceis de se inserir nas cavidades impressas devido ao impedimento estereoquímico.

**Figura 32** - Resposta do sensor MIP/AuNP/RGO-GCE e NIP/AuNP/RGO-GCE em  $5,0 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup> de D-manitol, L-arabitol, Mio-inositol, glicerol, frutose e glicose em meio de PBS pH 6,5, após incubação de 15 min.



Fonte: adaptado de Beluomini et al.(79)

Um fator matemático para cada molécula passível de interferência foi definida como fator de impressão ( $\alpha$ ), Equação 5, definida como a razão entre  $\Delta I$  (diferença de corrente de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  após a remoção da molécula molde e depois da religação da molécula estudada) para MIP e para NIP.

$$\alpha = \frac{\Delta i_{pa} (MIP)}{\Delta i_{pa} (NIP)} \quad \text{Equação 5}$$

Assim, a partir do fator de impressão é possível obter o fator de seletividade, Equação 6, que pode ser expresso como:

$$\beta = \frac{\alpha_{manitol}}{\alpha_{interferente}} \quad \text{Equação 6}$$

Analisando os dados da Tabela 5, o fator de impressão  $\alpha$  foi maior para a molécula de D-manitol do que para as demais moléculas, sugerindo que o sensor apresentou reconhecimento para a molécula de D-manitol em comparação com o sensor não impresso. Analisando os

valores encontrados para o fator de seletividade  $\beta$ , o sensor mostrou ser muito mais seletivo para D-manitol do que para as outras moléculas, sugerindo que alta seletividade para a molécula de interesse.

**Tabela 5** - Seletividade do sensor MIP/AuNP/RGO-GCE para  $5,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de D-manitol e possíveis interferentes.

<b>Molécula</b>	<b>MIP (<math>\mu</math>A)</b>	<b>NIP (<math>\mu</math>A)</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>\beta</math></b>
Manitol	29,9	6,1	4,8	1,0
Arabitol	9,0	5,8	1,5	3,1
Mio-inositol	6,7	5,0	1,3	3,6
Glicerol	9,3	5,0	1,8	2,6
Frutose	5,7	4,0	1,4	3,4
Glicose	5,8	5,0	1,1	4,2

Fonte: adaptado de Beluomini et al.(79).

#### 4.2.7 Determinação da D-manitol em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar

O método de adição padrão foi utilizado para determinar a concentração de D-manitol presente em amostra de vinhaça de cana-de-açúcar, uma vez que esse minimiza as interferências introduzidas por matrizes complexas. Este método consiste em adicionar concentrações conhecidas da substância de interesse à amostra. As concentrações de D-manitol adicionadas foram na faixa de  $2,0 \times 10^{-12}$  a  $6,0 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup> e uma curva analítica foi construída, relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra e o sinal analítico por DPV. As amostras foram preparadas conforme descrito na seção experimental 3.12. Todas as medidas foram realizadas em triplicada e em eletrodos diferentes. Os resultados são listados na Tabela 6.

Através da construção da curva, por extrapolação da reta até o eixo das abscissas, levando em consideração as diluições a concentração de  $0,19 \pm 0,05$  mg de D-manitol foi encontrada por litro de vinhaça. Sabendo que a produção de etanol em 2016/2017, no Brasil, foi de 30,3 bilhões de litros [38], cerca de 454,4 bilhões de litros de vinhaça foram produzidos.

Portanto, se todo o D-manitol fosse recuperado, uma quantidade expressiva de 86,3 ton estaria disponível para ser utilizada pela indústria alimentícia e/ou farmacêutica.

Para o cálculo da recuperação, para avaliar se a quantidade adicionada corresponde ao esperado, a concentração detectada foi dividida pelo valor efetivamente adicionado e multiplicado por cem, obtendo-se assim a percentagem de recuperação. Os intervalos aceitáveis de recuperação são entre 70 e 120 %. No presente estudo, as recuperações ficaram entre 97,5 % a 106 %, indicando que o método apresentou um excelente grau de exatidão, sendo eficaz e confiável para a determinação de D-manitol.

**Tabela 6** - Determinação de D-manitol em amostras de vinhaça de cana (n = 3).

<b>Amostra</b>	<b>Quantidade adicionada<sup>*</sup></b>	<b>Quantidade detectada<sup>*a</sup></b>	<b>Recuperação (%)</b>
	-	5,2 ± 0,5	-
Vinhaça	2,0	7,3 ± 1,0	106,0
	4,0	9,1 ± 0,9	97,5
	6,0	11,3 ± 1,2	101,6

\* 10<sup>-12</sup> mol L<sup>-1</sup>. <sup>a</sup>Média ± desvio padrão

Fonte: adaptado de Beluomini et al.(79).

### 4.3 Formação do MIP/NiNP/RGO-GCE para determinação de mio-inositol

Nessa subseção será discutido a preparação do eletrodo de NiNP em RGO-GCE, sua caracterização eletroquímica, química e morfológica bem como sua aplicação como substrato na formação do MIP. Será discutido o comportamento voltamétrico do mio-inositol no eletrodo modificado e o desenvolvimento do método analítico para detecção do mio-inositol e, por fim, será realizada a determinação desse composto na vinhaça de cana-de-açúcar.

#### 4.3.1 Eletrodeposição de NiNP em RGO-GCE

Visto que o eletrodo de GCE e RGO-GCE é incapaz de oxidar as polióis, a modificação do eletrodo com metais e óxidos metálicos se torna imprescindível para a obtenção dos sensores.

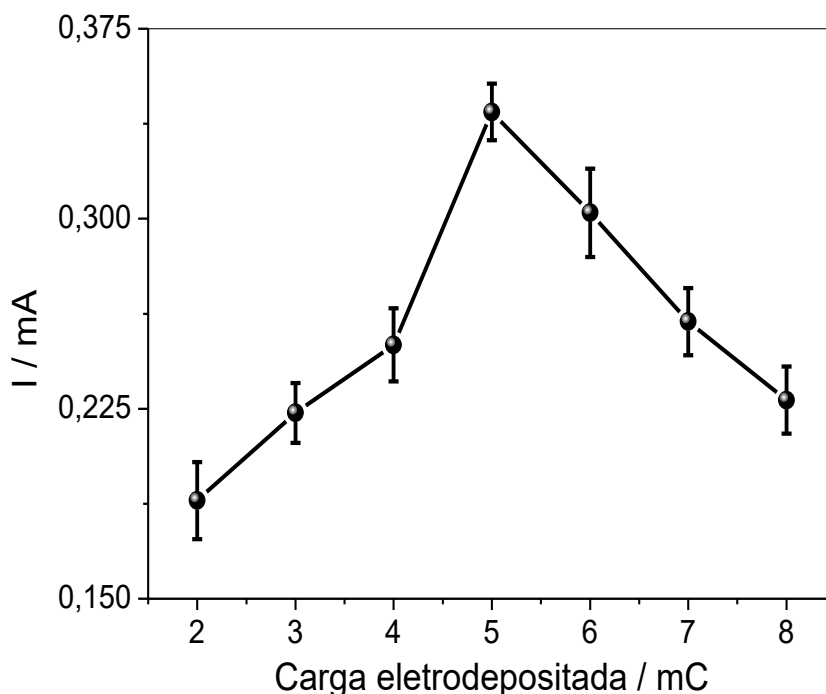
A eletrodeposição de nanopartículas metálicas em superfície de GCE e RGO-GCE vem sendo realizada pelo nosso grupo de pesquisa com sucesso, como podemos observar nos trabalhos publicados na literatura nos últimos anos (11, 48, 100–103). Entre as nanopartículas metálicas obtidas com êxito, as nanopartículas de níquel se destacam na detecção de compostos orgânicos (11, 48, 100).

Assim, a eletrodeposição de NiNP foi realizada por cronoamperometria sobre o RGO-GCE. A influência da carga e do potencial na eletrodeposição do níquel foi estudada sobre a resposta voltamétrica de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de mio-inositol em 0,10 mol L<sup>-1</sup> NaOH. Para a eletrodeposição controlada em superfície de RGO-GCE, uma solução contendo  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> NiSO<sub>4</sub> em meio de 0,10 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi utilizada até que a carga de interesse fosse atingida. Posteriormente, o eletrodo modificado foi removido da solução e colocado em outra célula eletroquímica contendo 0,10 mol L<sup>-1</sup> de NaOH, onde realizou-se 30 ciclos sucessivos no intervalo de potencial de 0,10 a 0,70 V a 50 mV s<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados em triplicada.

Analisando a Figura 33 é possível observar a influência da carga na corrente de oxidação do mio-inositol. Com o aumento da carga eletrodepositada até 5,0 mC, a resposta do eletrodo foi crescente, diminuindo gradativamente com a aplicação de cargas superiores. Esse comportamento ocorre, provavelmente, devido ao aumento do tamanho das nanopartículas na superfície do RGO-GCE até a formação de filme, em cargas superiores a 5,0 mC, ocasionando

uma menor atividade eletroquímica do NiNP/RGO-GCE e conseqüentemente uma menor sensibilidade para a oxidação da molécula.

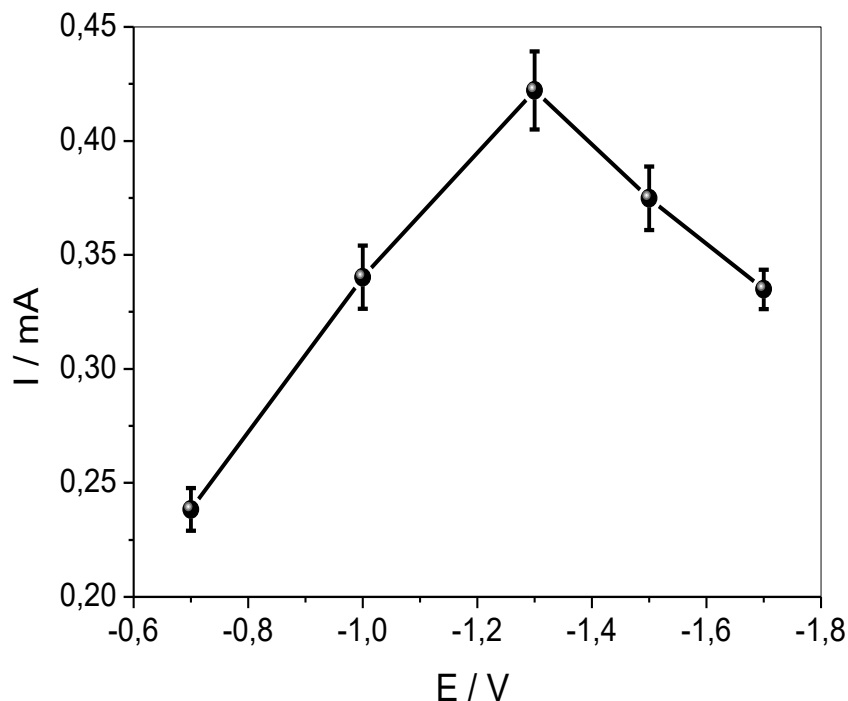
**Figura 33** - Resposta do eletrodo na oxidação de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de mio-inositol em 0,10 mol L<sup>-1</sup> de NaOH por DPV, em diferentes cargas aplicadas na eletrodeposição de nanopartículas de níquel em RGO-GCE.



Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104)

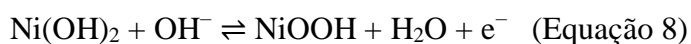
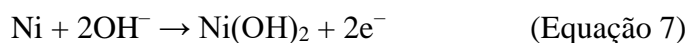
Após o estudo da carga eletrodepositada, foi avaliado o efeito do potencial na redução do níquel na superfície do eletrodo, pois sabe-se que este parâmetro tem forte influência na morfologia das nanopartículas. Para a escolha do melhor potencial, um estudo foi realizado na faixa de -0,70 a -1,7 V conforme podemos observar na Figura 34. A redução dos íons Ni<sup>2+</sup> ocorre em torno do potencial de -0,70 V (11), porém no potencial de -1,3 V um curto período de tempo foi necessário para atingir a carga de 5,0 mC. Além disso, este potencial apresentou maior corrente de pico na oxidação do mio-inositol, provavelmente devido ao aumento da área eletroativa proporcionado pela formação das nanopartículas. Com o aumento do potencial catódico a resposta decaiu, isso pode ser atribuído ao aumento do tamanho das nanopartículas, que pode gerar um recobrimento total na superfície do RGO-GCE, levando a formação de filme, diminuindo a área eletroativa e produção de H<sub>2</sub>.

**Figura 34** - Resposta do eletrodo na oxidação de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de mio-inositol em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH por DPV, em diferentes potenciais para a eletrodeposição de nanopartículas de níquel em RGO-GCE.



Fonte: elaborado pelo autor.

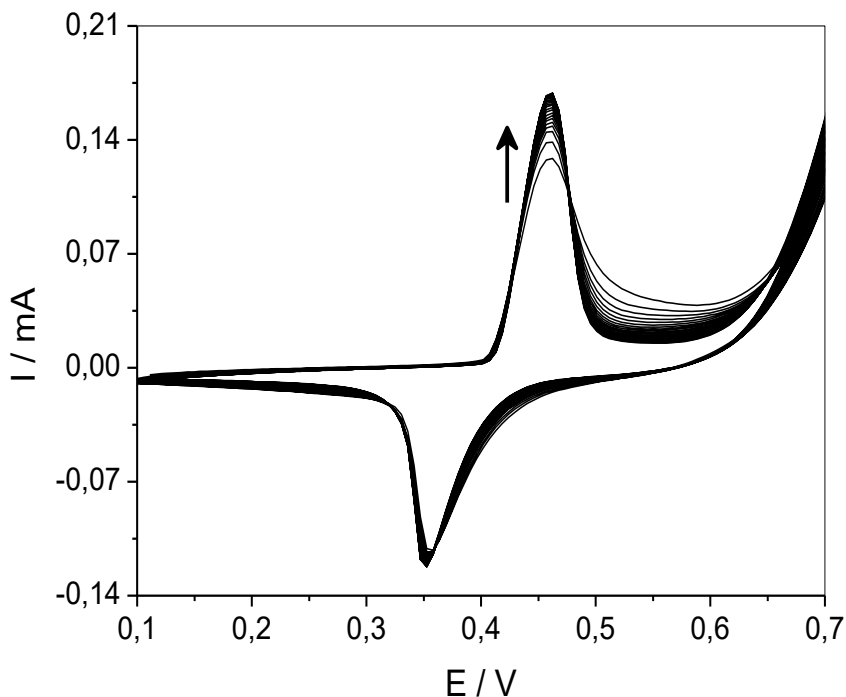
Assim, para a eletrodeposição de nanopartículas de NiNP sobre RGO-GCE, o potencial de  $-1,3 \text{ V}$  foi aplicado até atingir a carga de  $5,0 \text{ mC}$  em solução contendo  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{NiSO}_4$  em meio de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Após isso, o eletrodo modificado com as nanopartículas foi colocado em solução contendo  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH, onde foi realizado 30 ciclos sucessivos no intervalo de potencial de  $0,10$  a  $0,70 \text{ V}$  a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Em solução alcalina, o níquel metálico é oxidado a  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  (Equação 7), que é eletrooxidado para óxido-hidróxido níquel ( $\text{NiOOH}$ ) em potencial de aproximadamente  $0,45 \text{ V}$ , conforme descrito nas equação 8.



A Figura 35 mostra o par redox  $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$  bem definido durante a formação do óxido-hidróxido níquel, com  $E_{pa}$  de  $0,45 \text{ V}$  e  $E_{pc}$  de  $0,35 \text{ V}$ , de acordo com a Equação 8. Com o

aumento do número de ciclos, foi observado um aumento nos valores  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$ , isso pode ser explicado pela entrada de espécies  $\text{OH}^-$  na estrutura das nanopartículas de  $\text{Ni}(\text{OH})_2$ , as quais levam a formação das espécies  $\text{NiOOH}$  (11).

**Figura 35** - Sucessivos voltamogramas cíclicos de NiNP/RGO-GCE em solução de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{NaOH}$ , no intervalo de potencial de  $0,10$  a  $0,70 \text{ V}$  a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

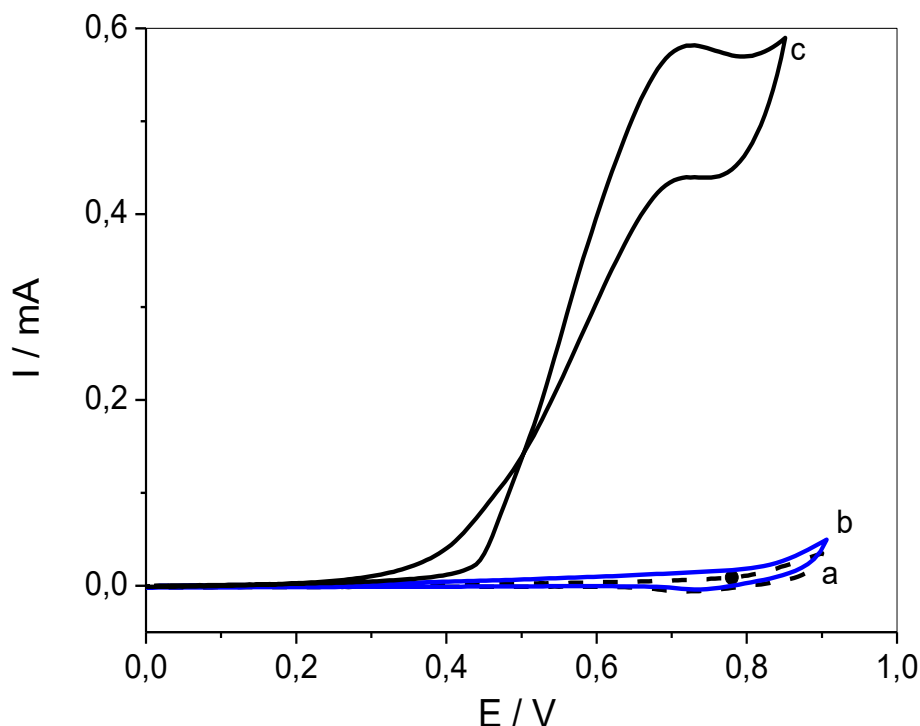


Fonte: Beluomini et al. (104)

O comportamento eletroquímico da molécula de mio-inositol em meio alcalino nos eletrodos de GCE, RGO-GCE e NiNP/RGO-GCE é mostrado na Figura 36. Como podemos observar, a molécula não sofre oxidação em eletrodo não modificado ou somente modificado com RGO. Porém, quando as nanopartículas de níquel oxidadas foram acionadas na superfície do RGO-GCE, a molécula apresentou um pico de oxidação no potencial de  $0,70 \text{ V}$ . Isso pode ser explicado pelo fato das NiNPs em meio alcalino gerarem eletroquimicamente as espécies de  $\text{NiOOH}$  que exibem uma poderosa atividade catalítica durante a oxidação dos polióis como mostra a Equação 9 a seguir.



**Figura 36** - Voltamograma cíclico para  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de mio-inositol em 0,10 mol L<sup>-1</sup> de NaOH em (a) GCE (b) RGO-GCE e (c) NiNP/RGO-GCE.



Fonte: elaborado pelo autor.

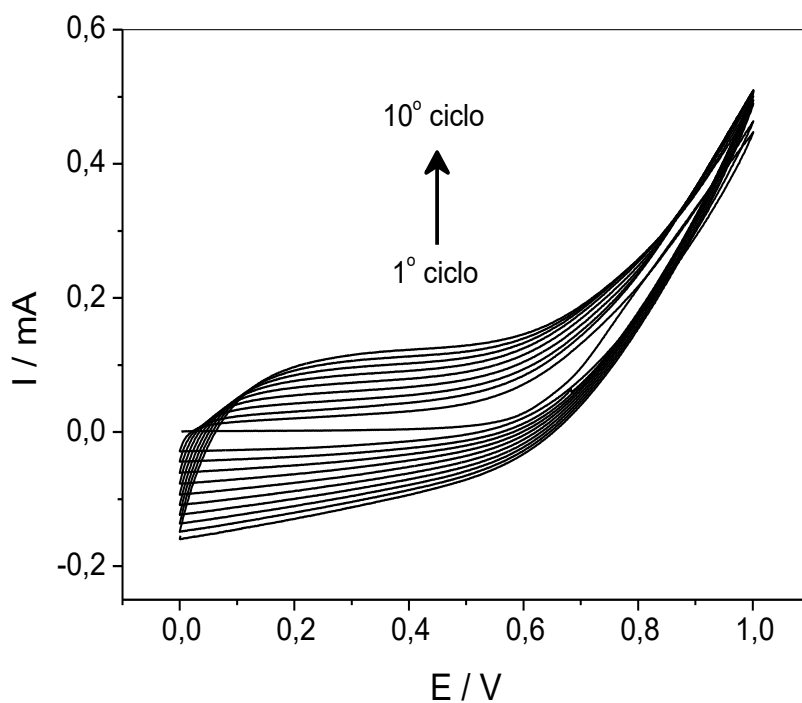
#### 4.3.2 Eletropolimerização de pirrol em NiNP/RGO-GCE para detecção de mio-inositol

Após a formação do NiNP/RGO-GCE, o eletrodo foi utilizado como substrato para formação do MIP. Para se obter uma boa impressão molecular o substrato precisa apresentar boas propriedades elétricas, capacidade de adsorção, elevada área superficial e elevada atividade eletroquímica de sua superfície para que a eletropolimerização seja realizada com sucesso.

O processo de eletropolimerização do pirrol no eletrodo modificado NiNP/RGO-GCE foi realizado por CV na faixa de potencial de 0,0 a 1,0 V a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  na presença de  $2,5 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de polipirrol (PPy) e  $7,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de mio-inositol em solução de 0,10 mol L<sup>-1</sup> LiClO<sub>4</sub>, durante 10 ciclos, como mostra a Figura 37. A formação do filme PPy pode ser facilmente observado devido ao aumento na intensidade da corrente à medida que o filme cresce, devido a formação do cátion radicalar no potencial de 0,15 V, levando a formação do polímero na superfície do eletrodo, como mostra o processo de polimerização da Figura 38. Durante este

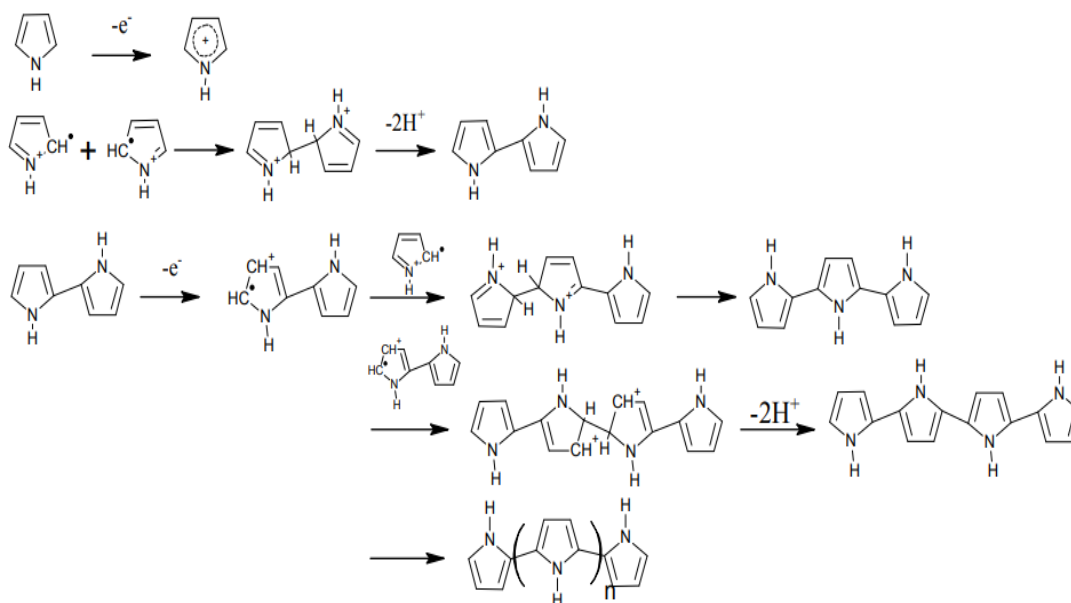
processo, as moléculas de mio-inositol são atraídas pelas unidades de pirrol devido às interações de hidrogênio entre o hidrogênio do grupo hidroxilo do mio-inositol e o átomo de nitrogênio do grupo N-H das unidades de pirrol, como mostra a Figura 39.

**Figura 37** - Voltamograma cíclico para a eletropolimerização de  $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de pirrol em  $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ , contendo  $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de mio-inositol em NiNP/RGO-GCE,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



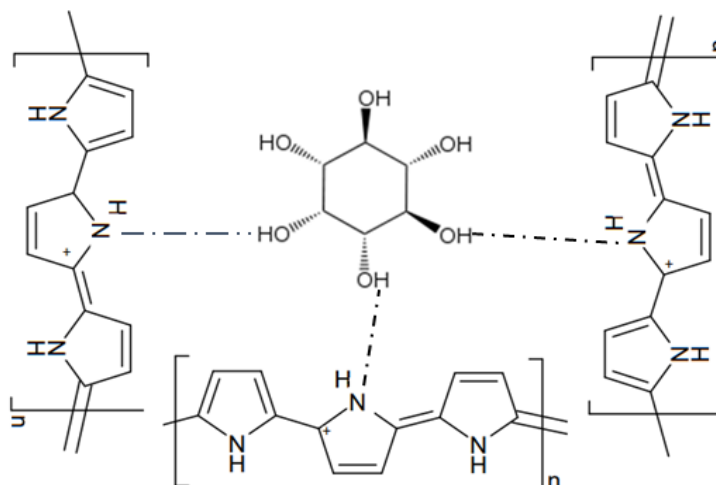
Fonte: Beluomini et al. (104)

**Figura 38** - Processo de polimerização do pirrol.



Fonte: Schweiger et al. (105).

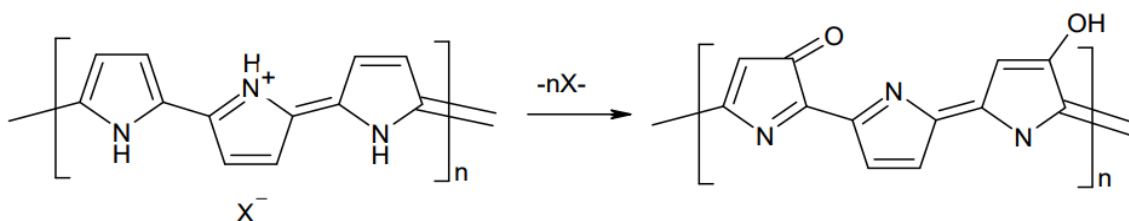
**Figura 39** - Interação das unidades de PPy com a molécula de mio-inositol durante o processo de eletropolimerização.



Fonte: elaborado pelo autor.

Após a eletropolimerização, a formação das cavidades impressas para o reconhecimento molecular de mio-inositol foi realizada através da superoxidação (em inglês: *overoxidation*) do PPy. A superoxidação anódica do PPy é realizada na presença de nucleófilos, em que os cátions radicalares do polímero sofrem oxidação irreversível em potenciais anódicos elevados, como mostra a Figura 40. Durante a superoxidação, a estrutura  $\pi$ -conjugada do filme é perdida e os dopantes presentes na estrutura (no caso da formação do MIP, o analito) é expelido da matriz polimérica, e grupos contendo oxigênio, como carbonilo e carboxilo, são introduzidos nas unidades de pirrol, resultando na perda de condutividade do filme, que se torna permeoseletivo (106). Os filmes superoxidados de PPy possuem inúmeras aplicações eletroanalíticas pois a película superoxidada funciona como permutador catiônico para o eletrodo, que passa a possuir propriedades de peneira molecular (107).

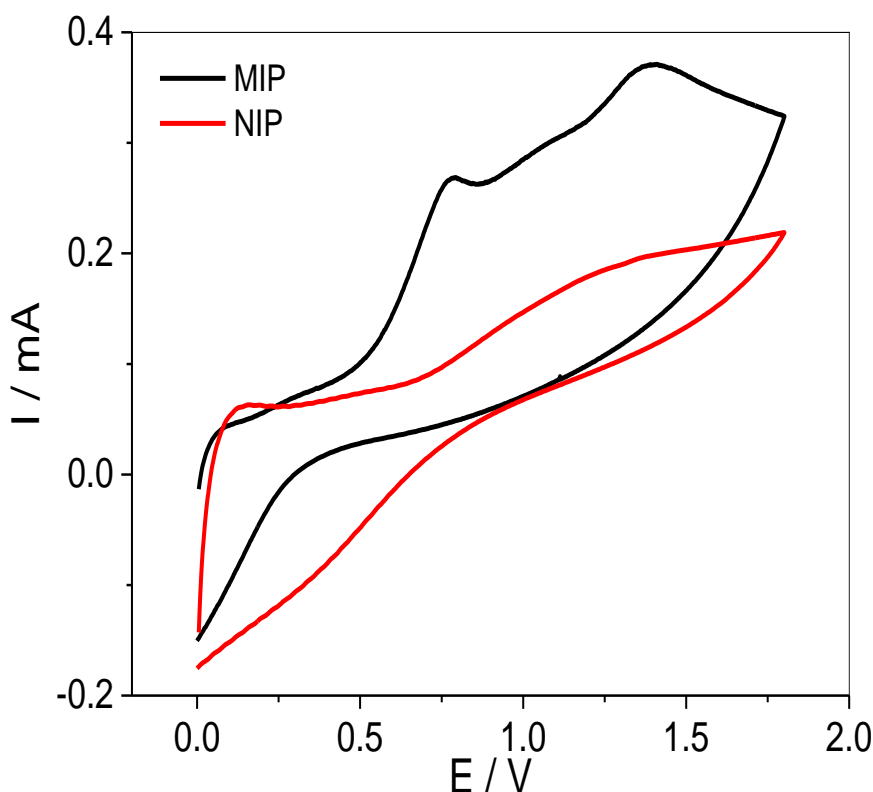
**Figura 40** - Reação de superoxidação do polipirrol.



Fonte: Özkorucuklu et al. (107).

A superoxidação ocorre mais facilmente na presença de nucleófilos fortes, como  $\text{OH}^-$ , e em potenciais acima de 1,0 V (107). Assim, o processo de superoxidação do PPy foi realizado em solução contendo  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH na faixa de potencial de 0,0 V a 1,8 V com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . A Figura 41 mostra o primeiro ciclo da superoxidação do PPy na presença e na ausência de mio-inositol. Durante a varredura para expulsão da molécula de mio-inositol da matriz polimérica, observa-se um pico voltamétrico irreversível em 0,70 V para o MIP, correspondente a oxidação do mio-inositol e outro pico em 1,3 V, atribuído à superoxidação do PPy. Para confirmar que o pico em 0,70 V corresponde a oxidação de mio-inositol, o NIP foi aplicado nas mesmas condições e nenhum pico foi observado, como mostra o voltamograma em vermelho da Figura 41. Os ciclos subsequentes da superoxidação do PPy exibiram diminuição da corrente de pico, devido à perda de condutividade do filme. Esses resultados serão mostrados na seção que abordará o efeito do número de ciclos durante a superoxidação do polímero.

**Figura 41** - Voltamograma cíclico da superoxidação do filme de PPy em 0,10 mol L<sup>-1</sup> de NaOH para MIP e NIP,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104).

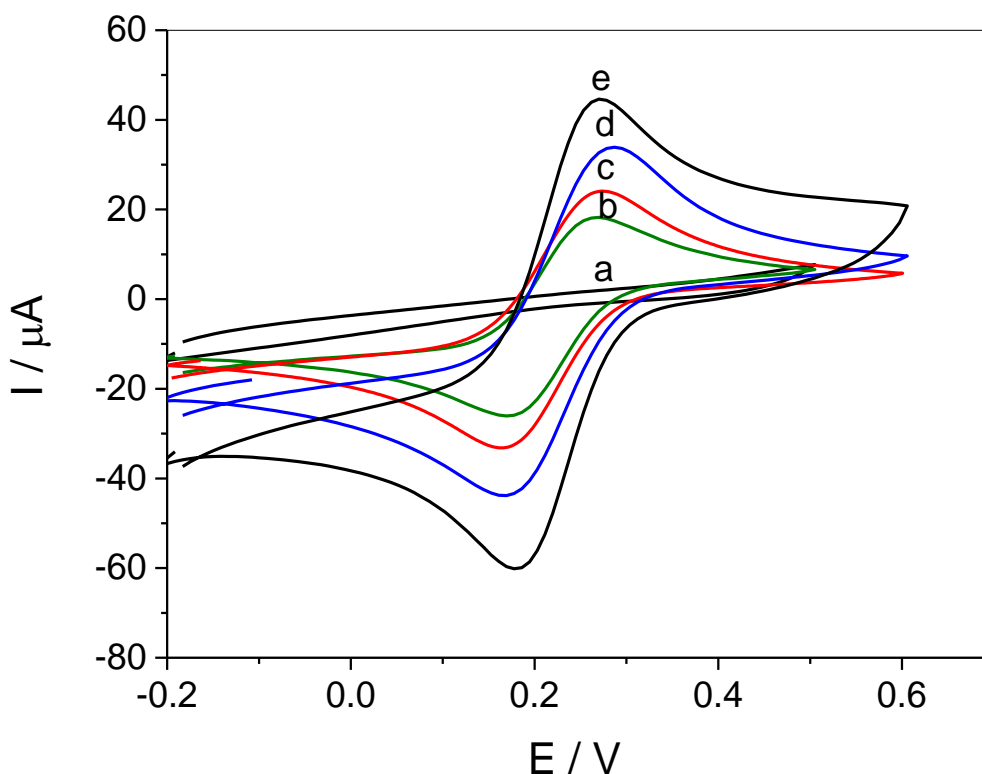
O passo a passo da preparação do MIP foi acompanhado por CV, utilizando como sonda redox  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$  em 0,10 mol L<sup>-1</sup> de KCl a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  no intervalo de -0,20 a 0,60 V, como mostra a Figura 42. O uso da sonda redox foi necessário pois após a superoxidação do filme em meio de NaOH, a etapa de religação da molécula nas cavidades formadas é realizada em meio neutro, uma vez que o filme não pode permanecer exposto por longos períodos em solução alcalina, pois pode sofrer degradação (108). Além disso, como já mencionado, a molécula de mio-inositol não apresenta eletroatividade em soluções neutras.

Na curva c, podemos observar o par de picos redox reversíveis bem definidos no GCE sem modificação. Quando o GCE é modificado com NiNP/RGO (curva e) observa-se um aumento na corrente de pico, sugerindo que a modificação do eletrodo resultou em um aumento da área de superfície e melhoramento do transporte de massa quando as nanopartículas são utilizadas. Em seguida, a superfície modificada com NiNP/RGO-GCE foi modificada com PPy e mio-inositol para formação do MIP/NiNP/RGO-GCE. Analisando a curva a podemos notar

que a corrente do par de picos redox decaíu, pois o filme polimérico bloqueou a chegada da sonda  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  à superfície do eletrodo.

Quando as moléculas de mio-inositol foram removidas da matriz polimérica por superoxidação do PPy, a resposta da corrente aumentou, como se pode observar na curva d, sugerindo a formação das cavidades, que permitiu a transferência eletrônica da sonda para a superfície do eletrodo. Após a formação das cavidades impressas, o MIP/NiNP/RGO-GCE foi utilizado para o reconhecimento da molécula de mio-inositol. Para isso, o MIP foi colocado em uma solução contendo  $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de mio-inositol em PBS pH 6,5 durante 20 minutos. Um declínio na resposta do eletrodo foi observado – ver curva b, mostrando que as moléculas de mio-inositol se religaram nas suas cavidades complementares e, conseqüentemente, menos locais ficaram acessíveis para que a sonda pudesse atravessar e atingir a superfície do eletrodo.

**Figura 42** - Voltamogramas cíclicos de (a) MIP/NiNP/RGO-GCE após eletropolimerização (b) GCE, (c) MIP/NiNP/RGO-GCE após 20 minutos de religação em solução de mio-inositol  $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (d) MIP/NiNP/RGO-GCE após remoção de mio-inositol (e) NiNP/RGO-GCE. Todas as medidas foram realizadas em solução contendo  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104)

### 4.3.3 Estudo dos parâmetros que influenciam a formação do MIP/NiNP/RGO-GCE

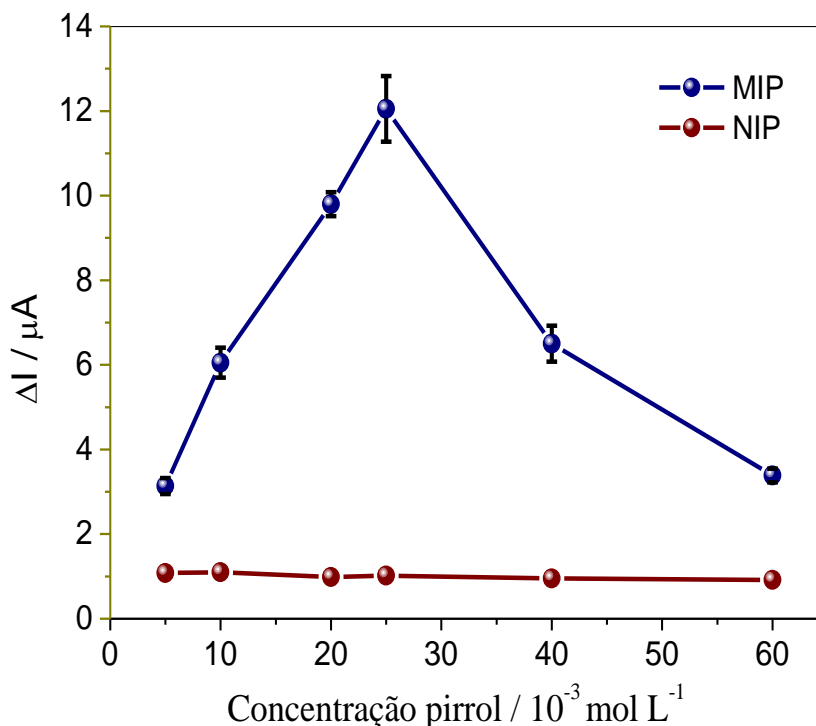
Os principais parâmetros que podem afetar de forma crucial a formação do MIP baseado em pirrol são: concentração do monômero, concentração de mio-inositol, número de ciclos durante a eletropolimerização, número de ciclos para a superoxidação do polipirrol, tempo de incubação e pH da solução de incubação. Estes parâmetros foram escolhidos porque são fatores-chave para se obter estabilidade física do polímero, com espessura adequada e qualidade das cavidades formadas na matriz polimérica.

Para avaliar as condições ideais para a preparação do MIP, a variação da corrente na oxidação da sonda  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ( $\Delta I$ ) foi avaliada usando DPV.

#### 4.3.3.1 Efeito da concentração de pirrol

O efeito da concentração de pirrol na preparação do MIP está diretamente relacionado à espessura e sensibilidade do filme. A concentração do monômero foi avaliada na faixa de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a  $6,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , em solução de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{LiClO}_4$  contendo  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de mio-inositol, como mostrado na Figura 43. Quando a concentração do PPy foi baixa, uma menor variação na corrente foi observada, sugerindo que o polímero não interagiu de forma eficiente com a molécula. Ao aumentar a concentração do monômero, podemos observar uma rápida eletropolimerização, que tem como consequência a diminuição da sensibilidade do sensor, pois as moléculas de mio-inositol não são pressas adequadamente na matriz polimérica. Verificou-se que a variação de corrente foi máxima na concentração de  $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . O NIP também foi testado para comparação dos resultados. Assim, foi escolhida a concentração de  $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de pirrol para dar continuidade aos estudos.

**Figura 43** - Efeito da concentração de pirrol durante a eletropolimerização com (MIP) e sem (NIP) mio-inositol, em DPV na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.

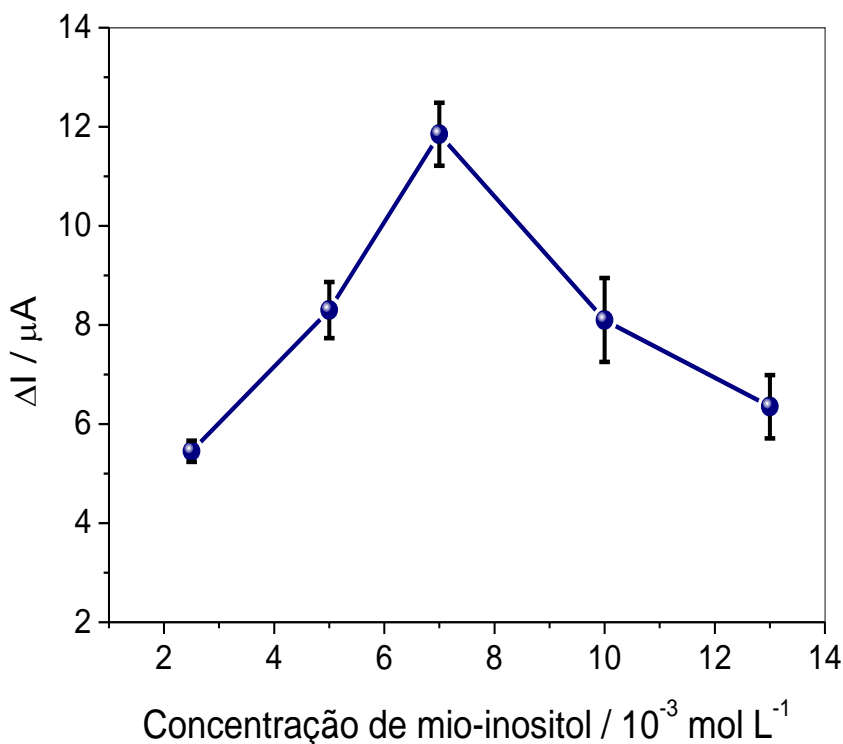


Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104)

#### 4.3.3.2 Efeito da concentração de mio-inositol

A concentração da molécula de mio-inositol é, sem dúvida, um dos parâmetros mais importantes durante o desenvolvimento do MIP. Isso se deve ao fato de que, a concentração da molécula está diretamente relacionada com a quantidade de cavidades de reconhecimento disponíveis para a detecção. Assim, a concentração de mio-inositol foi estudada na faixa de  $2,5 \times 10^{-3}$  a  $1,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  como mostra a Figura 44. Analisando a figura é possível observar que um maior  $\Delta I$  foi obtido quando a concentração de mio-inositol foi de  $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Observou-se que, em concentrações mais baixas de mio-inositol, a resposta do sensor diminuiu. Isso pode ser atribuído ao fato de que uma diminuição na concentração de mio-inositol leva à formação de um menor número de locais impressos na superfície do eletrodo, que por sua vez, provoca uma diminuição da sensibilidade. O mesmo efeito é observado quando a quantidade de mio-inositol é superior a  $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , uma vez que maiores concentrações dessas moléculas podem levar a sua aglomeração e formação de cavidades maiores, prejudicando a seletividade do sensor. Assim, a concentração ideal da solução de mio-inositol foi de  $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

**Figura 44** - Efeito da concentração de mio-inositol durante a eletropolimerização com pirrol na resposta do MIP em DPV na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.



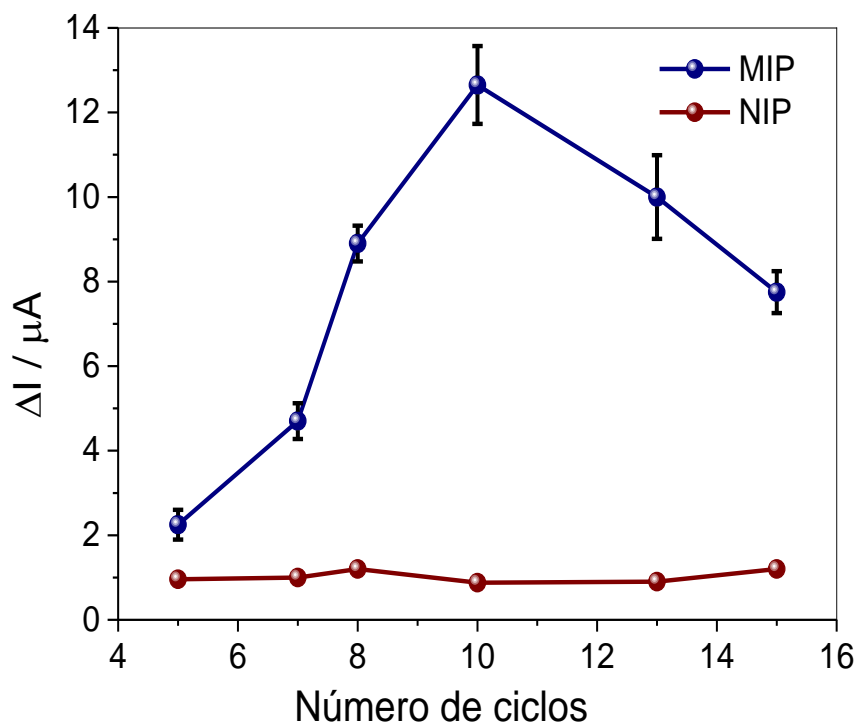
Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104)

#### 4.3.3.3 Efeito do número de ciclos na eletropolimerização

O número de ciclos durante o processo de eletropolimerização está diretamente relacionado à espessura do filme, que tem forte influência sobre a sensibilidade do sensor.

A Figura 45 mostra a resposta do sensor feito em diferentes números de ciclos durante a etapa de eletropolimerização do pirrol na presença (MIP) e na ausência (NIP) da molécula de mio-inositol. Como podemos observar, a variação da corrente foi máxima para 10 ciclos de eletropolimerização. Em ciclos menores que 10, a resposta do sensor não foi satisfatória, devido a formação de um filme muito fino na superfície do eletrodo, que se rompeu durante o processo de remoção da molécula molde. Em ciclos superiores a 10, a resposta do sensor foi decrescente, provavelmente devido a maior espessura do filme, que pode dificultar a sonda redox de atingir algumas cavidades situadas mais no interior da matriz polimérica, dificultando a transferência de massa. Assim, o número ótimo de ciclos escolhidos para a eletropolimerização foi de 10 ciclos.

**Figura 45** - Influência do número de ciclos durante a eletropolimerização de pirrol na presença (MIP) e na ausência (NIP) de mio-inositol. A variação da resposta foi analisada por DPV na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.



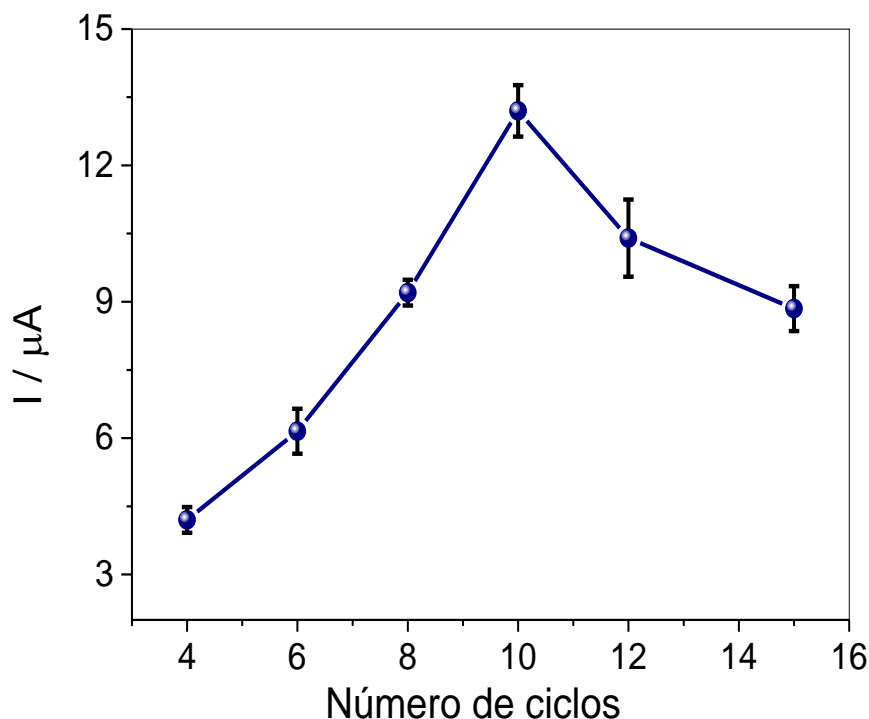
Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104)

#### 4.3.3.4 Efeito do número de ciclos para remoção de mio-inositol

Para melhorar a sensibilidade e seletividade do MIP, é muito importante remover a molécula modelo completamente da estrutura polimérica. Assim, a superoxidação do filme de PPy foi escolhida para remoção da molécula de mio-inositol. Quando PPy é superoxidado, os grupos contendo oxigênio são introduzidos na cadeia do polímero, levando à perda da carga catiônica no átomo de N, facilitando a remoção da molécula de mio-inositol, que quando em solução se apresenta na forma aniônica. Neste sentido, a sobreoxidação do PPy pode criar cavidades complementares à forma, ao tamanho e à funcionalidade da molécula de mio-inositol, conforme discutido anteriormente. Sabendo disso, o polímero foi superoxidado na faixa de potencial de 0,0 a 1,8 V, em solução contendo  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH e o número de ciclos foi estudado entre 3 e 15. Como podemos observar na Figura 46, a variação da corrente foi máxima após a varredura de 10 ciclos. Em ciclos inferiores, a extensão da sobreoxidação não foi suficiente para remover completamente a molécula da matriz polimérica. Além disso, durante a execução do experimento foi observado que em ciclos superiores a 10, ocorreu a ruptura do

filme, provavelmente devido a oxidação excessiva, que culminou no desgaste da superfície do PPy. Assim, o número de ciclos escolhido para a superoxidação do PPy capaz de remover a molécula molde e sem prejudicar a estrutura polimérica, foi de 10 ciclos.

**Figura 46** - Influência do número de ciclos durante a superoxidação de pirrol para remoção da molécula de mio-inositol. A variação da resposta foi analisada por DPV na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.

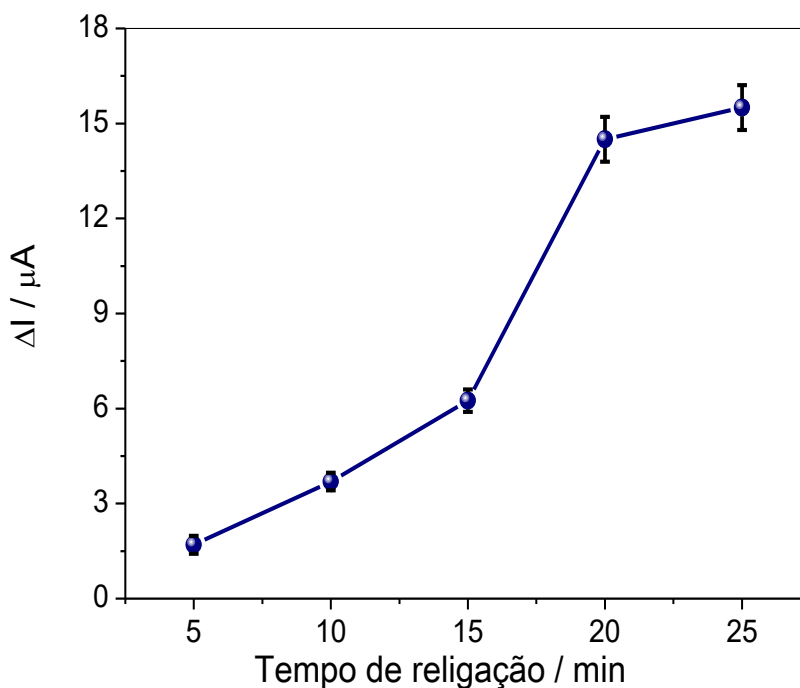


Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104).

#### 4.3.3.5 Influência do tempo na religação da molécula de mio-inositol nas cavidades do MIP

Após a formação do MIP, o eletrodo foi colocado em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de PBS (pH 6,0) contendo  $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de mio-inositol, com agitação de  $\sim 50 \text{ rpm}$ , para que as moléculas se religassem especificamente nas cavidades formadas. O tempo necessário para que a religação se estabeleça foi estudado na faixa de 5 a 25 min. A resposta do MIP foi avaliada através da variação da corrente da sonda redox antes e após o MIP ser colocado na solução contendo a molécula de mio-inositol, como mostra a Figura 47. A variação da corrente foi crescente até se estabilizar após 20 min, indicando que a difusão da molécula para os sítios de reconhecimento foi completada.

**Figura 47** – Efeito do tempo de religação da molécula de mio-inositol na variação da resposta em DPV na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.

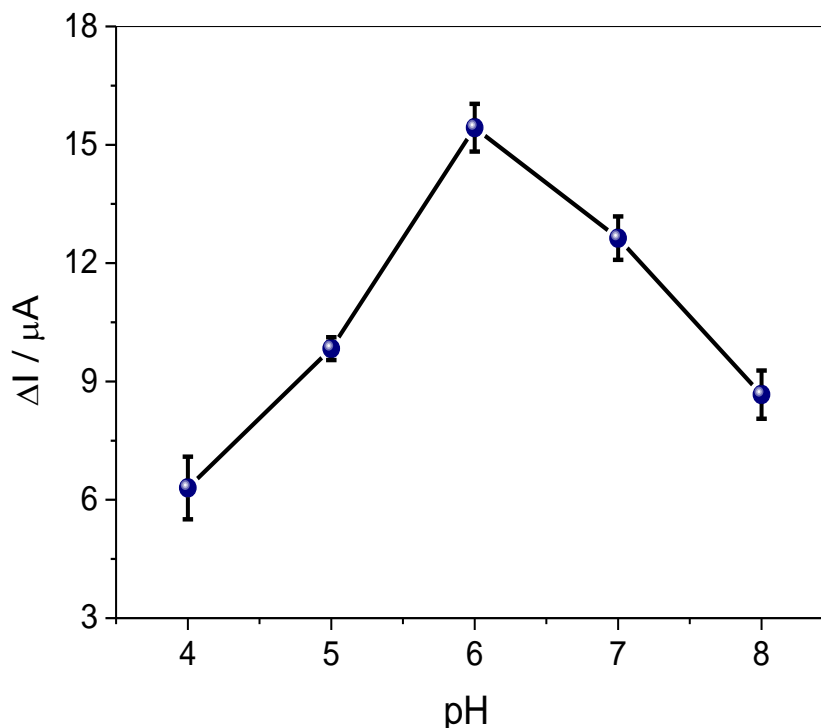


Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104)

#### 4.3.3.6 Influência do pH na religação da molécula de mio-inositol

O valor do pH da solução para religação da molécula de mio-inositol exibiu um efeito significativo no comportamento eletroquímico do sensor. Como mostra a Figura 48, o estudo foi realizado na faixa de 4 a 8, usando solução tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . O MIP apresentou melhor resposta em pH 6, sugerindo que esse pH poderia facilitar a interação entre o mio-inositol e sua cavidade impressa. Em valores de pH mais baixos, a forma protonada da molécula de mio-inositol predomina e há baixa interação com os grupos funcionais e em valores maiores de pH, o mio-inositol poderia perder o seu próton. Portanto, o pH ideal da solução tampão fosfato na religação da molécula foi estabelecido em 6.0.

**Figura 48** - Influência do pH na religação da molécula de mio-inositol. Resultados avaliados na variação da resposta em DPV na presença de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.

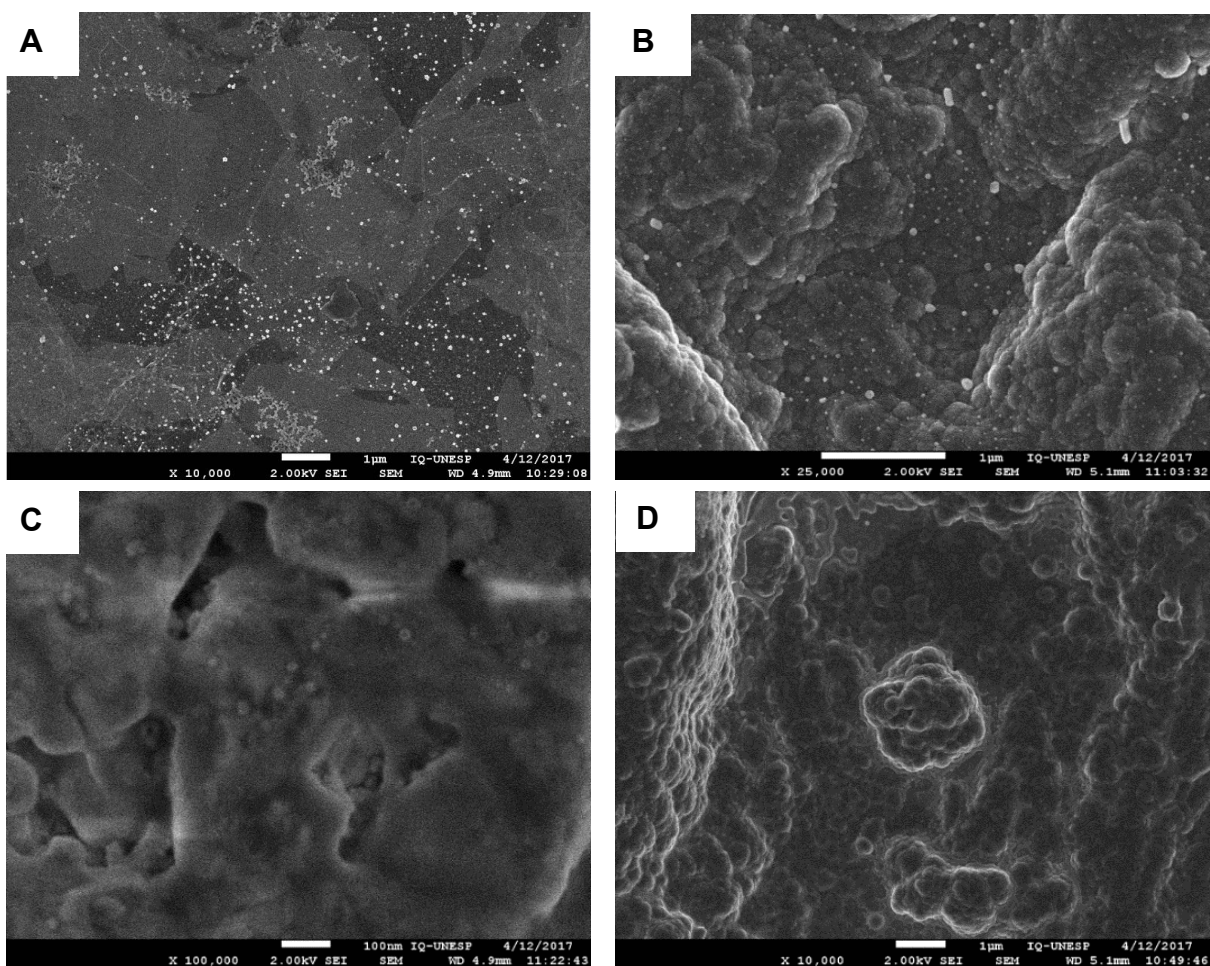


Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104).

#### 4.3.4 Caracterização do MIP/NiNP/RGP-GCE

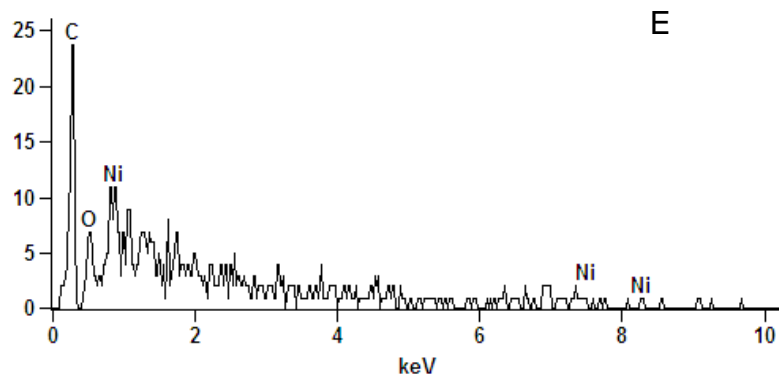
A análise morfológica da superfície foi realizada por MEV e AFM. A Figura 49 mostra as morfologias da superfície de NiNP/RGO-GCE e MIP/NiNP/RGO-GCE usando MEV. A Figura 49 – A e 49 – B mostra a imagem da eletrodeposição uniforme e homogeneamente distribuída das NiNPs nas folhas de óxido de grafeno reduzido, em diferentes ampliações, indicando o sucesso da eletrodeposição, em que as nanopartículas de níquel apresentaram diâmetros de 60 nm. O EDS mostrado na Figura 49 – E comprova a existência do níquel no material. A morfologia da formação do MIP/NiNP/RGO-GCE sobre a superfície do eletrodo é mostrado na Figura 49 – C e na Figura 49 – D a morfologia após a superoxidação do PPy. É possível observar que a superfície do MIP antes da superoxidação é mais homogênea e menos rugosa, isso porque o processo de superoxidação leva a um rearranjo da cadeia polimérica e é formada uma típica morfologia de "couve-flor".

**Figura 49** - Imagens de MEV para (A) e (B) NiNP/RGO-GCE, (C) MIP/NiNP/RGO-GCE e (D) MIP/NiNP/RGO-GCE após superoxidação do PPy.



Full scale counts: 24

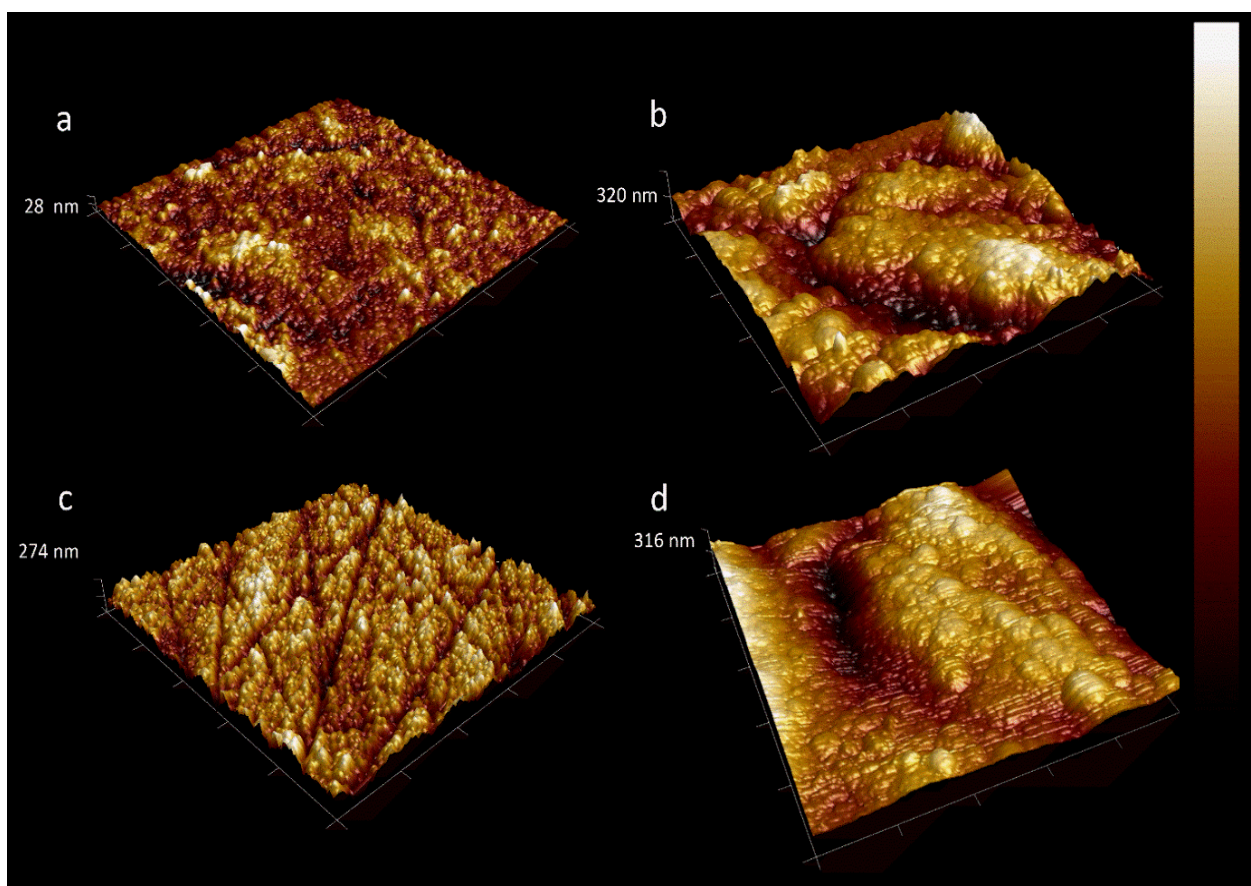
Ni-18(1)\_pt1



Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104)

As imagens de AFM 3D são mostradas na Figura 50. Na Figura 50 – A , podemos observar a modificação homogênea do eletrodo por NiNP/RGO, com nanopartículas com diâmetro médio de 62 nm de diâmetro e 28 nm de altura, corroborando com as imagens vistas por MEV. O valor da rugosidade da superfície, expressa em termos de raiz quadrática média, RMS, que é proporcional à aspereza, foi de 10 nm. Uma mudança na rugosidade é evidente quando o eletrodo foi modificado com o filme polimérico durante o processo de impressão molecular. Os valores de RMS obtidos para o MIP foi de 88 nm (Figura 50 – B) e para o NIP foi de 70 nm (Figura 50 – D). A altura média do filme PPy foi de 297 nm, mostrando que um filme relativamente plano e compacto foi formado na superfície do NiNP/RGO-GCE. O valor do RMS para o MIP após a superoxidação do PPy foi de 42 nm (Figura 50 – C), confirmando que a morfologia original foi alterada devido à degradação do polímero.

**Figura 50** - Imagens de AFM para (A) NiNP/RGO-GCE, (B) MIP antes e em (C) MIP após a remoção da molécula de mio-inositol, (D) NIP.

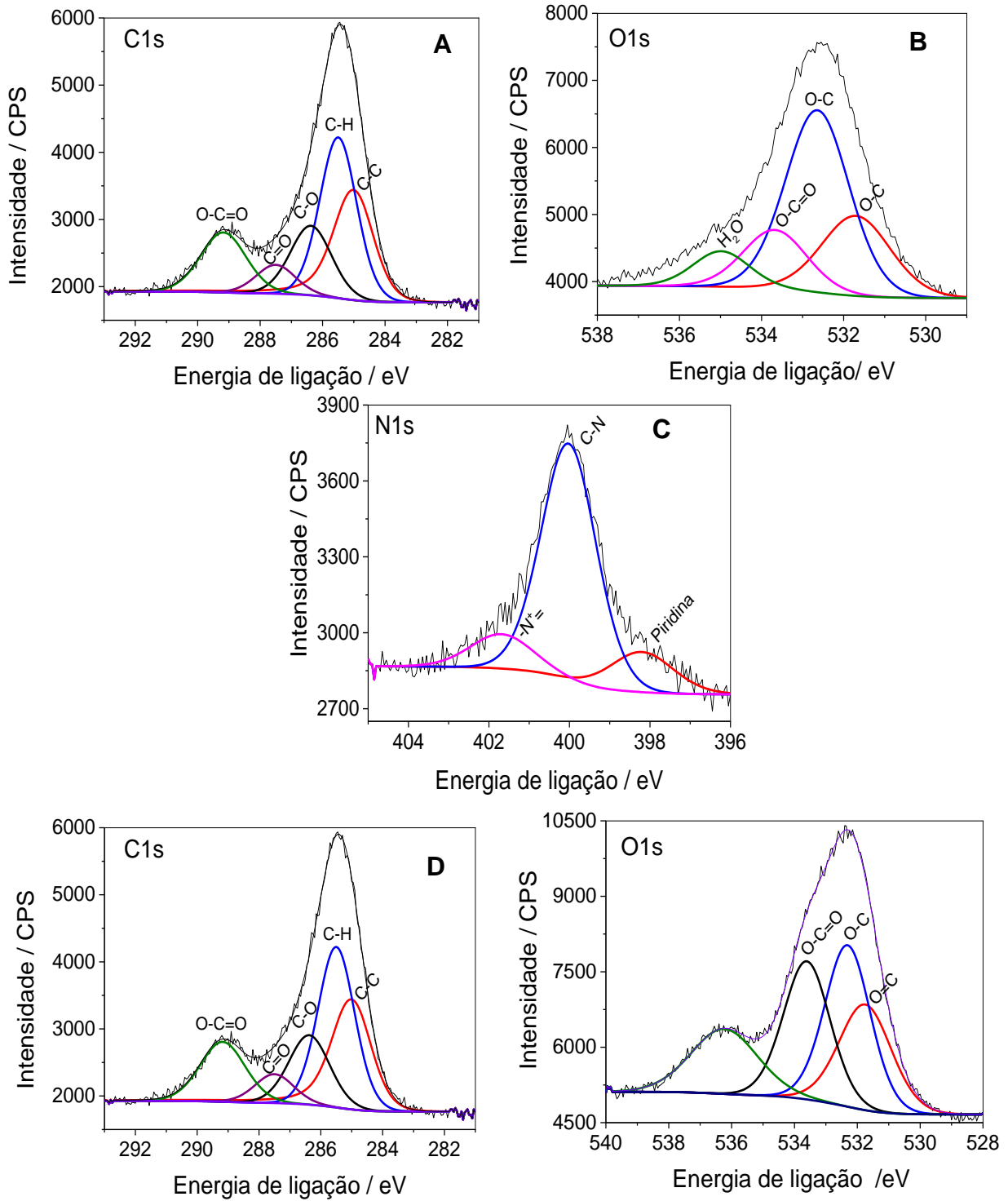


Fonte: Beluomini et al. (104).

A composição química do MIP também foi caracterizada por XPS (Figura 51). Esta caracterização teve como objetivo confirmar o processo de impressão além de investigar a superoxidação do PPy. O espectro C1s de alta resolução do MIP após eletropolimerização (Figura 51 – A) pode ser deconvoluído em cinco componentes. Um componente com BE de 285,0 eV correspondente a ligação C-H, que é derivado do carbono aromático do PPy. Os demais picos com BE de 285.5 (C-H), 286.8 (C-O), 287.7 (C = O) e 289.2 (O-C = O) eV são atribuídos aos grupamentos que ocorrem durante a formação do polímero. O espectro O1s de alta resolução do filme PPy (Figura 51 – B) pode ser deconvoluído em quatro componentes correspondentes aos átomos de oxigênio presentes em diferentes grupos funcionais sendo 531,8 eV (O=C), 532,3 eV (C-O), e 533,6 eV (O-C=O), esses grupos podem estar relacionando com a formação do MIP através da eletropolimerização com a molécula de mio-inositol. A Figura 48 – C mostra a intensidade dos átomos de N1s na matriz polimérica, que se apresentam na forma de imina = N-, com energia de ligação de 399,4 eV, amina –NH com BE ~ 399,5 eV e nitrogênio deficiente em elétrons, N<sup>+</sup> com BE ~ 401,5 eV, confirmando a formação do polímero.

O espectro de C1s após o processo de superoxidação do PPy (Figura 51 – D) não sofreu grandes alterações na intensidade dos grupos, já na Figura 51 – E, que mostra o espectro de O1s após a superoxidação, podemos observar por comparação com a Figura 51 – B, que houve um aumento da intensidade dos grupos oxigenados.

**Figura 51** - Espectro de XPS para C 1s (A) , O 1s (B) e N1s (C) após a eletropolimerização e C1s (D) e O1s(E) depois da superoxidação do PPy.



Fonte: adaptado de Beluomini et al.(104).

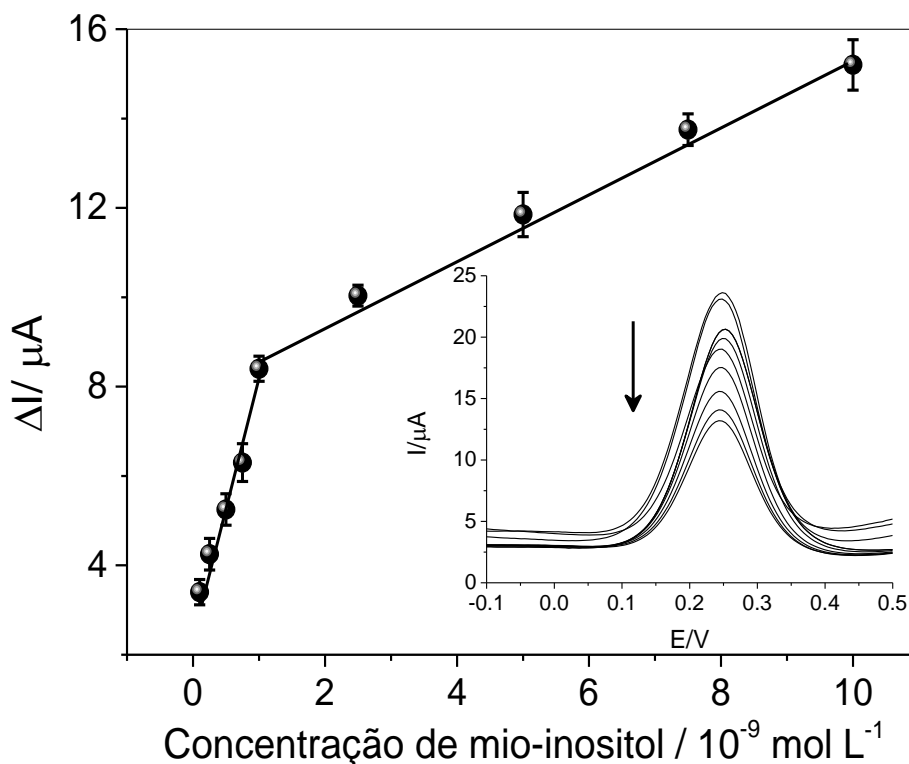
#### 4.3.5 Desempenho analítico do MIP/NiNP/RGO-GCE

Após a formação e caracterização do MIP/NiNP/RGO-GCE, o desempenho analítico do sensor foi avaliado por meio da construção da curva analítica. Para isso, as concentrações de mio-inositol de  $1,0 \times 10^{-10}$  a  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> em meio de PBS pH 6,0 foram utilizadas para avaliar o intervalo linear, a sensibilidade e o limite de detecção do sensor. Os resultados foram obtidos por meio da técnica de DPV usando a sonda redox Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>. Analisando a Figura 52, podemos observar que à medida que a concentração de mio-inositol foi aumentando, a corrente de pico diminuiu, como resultado da ocupação dos locais impressos no MIP pelas moléculas, que bloqueia a difusão da sonda. Assim, podemos relacionar a variação da corrente de pico ( $\Delta I$ ) com a concentração de mio-inositol que foi religada nas cavidades.

A redução do  $\Delta I$  foi proporcional à concentração de mio-inositol em duas faixas lineares:  $1,0 \times 10^{-10}$  a  $1,0 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> e  $1,0 \times 10^{-9}$  a  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, sendo o primeiro intervalo utilizado para o cálculo das figuras de mérito. Assim, a equação da regressão linear para este intervalo foi  $\Delta I$  ( $\mu A$ ) =  $4,5 \times 10^2 C_{\text{mio-inositol}} + 3,24 \times 10^{-6}$  com um coeficiente de correlação de 0,997, LD de  $7,6 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup>, LQ de  $2,0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> e sensibilidade amperométrica ( $S_a$ ) de  $4,5 \text{ mA L mol}^{-1}$ , ( $n = 3$ ).

Como já discutido anteriormente, a existência de dois intervalos lineares é atribuída à afinidade entre os sítios impressos e as moléculas de mio-inositol. Quando a concentração de mio-inositol é baixa, as moléculas ocupam as cavidades de alta afinidade localizadas na parte superficial do filme. Por outro lado, os locais de afinidade mais baixa localizados mais profundamente na matriz polimérica, são ocupados quando a concentração de mio-inositol é alta, causando um declínio na tangente da equação de regressão linear.

**Figura 52** - Curva de calibração para a detecção de mio-inositol usando MIP/NiNP/RGO-GCE em  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$  após 20 minutos de religação em PBS pH 6.0 contendo  $1,0 \times 10^{-10}$  a  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de mio-inositol. Os voltamogramas de DPV correspondente as concentrações de mio-inositol adicionadas estão na inserção inferior esquerda.



Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104)

O desempenho do sensor MIP/NiNP/RGO-GCE foi comparado com outros métodos reportados na literatura para detecção de mio-inositol, incluindo cromatografia gasosa, espectrometria de massas, espectrometria de massas em tandem acoplada à cromatografia líquida, espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa com ionização por electrospray e cromatografia líquida de troca. aniônica com detecção amperométrica pulsada. Analisando a Tabela 7 podemos observar que o sensor desenvolvido exibiu o menor limite de detecção em comparação com os outros métodos

**Tabela 7** - Comparação da faixa linear e limite de detecção de alguns métodos reportados na literatura para a determinação de mio-inositol.

<b>Método de detecção</b>	<b>Faixa linear (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
Cromatografia gasosa/ espectrometria de massa	$1,4 \times 10^{-6} - 1,4 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-6}$	(30)
Cromatografia líquida de alto eficiência acoplada a espectrometria de massa com ionização por electrospray	$2,5 \times 10^{-8} - 5,0 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-5}$	(31)
Espectrometria de massa em tandem acoplada à cromatografia líquida	$5,5 \times 10^{-7} - 5,5 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-7}$	(32)
Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente	$0 - 1,0 \times 10^{-5}$	$9,7 \times 10^{-8}$	(109)
Cromatografia líquida de alto eficiência	$2,8 \times 10^{-6} - 1,1 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-6}$	(110)
Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada*	$8,0 \times 10^{-9} - 8,0 \times 10^{-7}$	$8,0 \times 10^{-7}$	(34)
MIP/NiNP/RGO-GCE	$1,0 \times 10^{-10} - 1,0 \times 10^{-8}$	$7,6 \times 10^{-11}$	Este trabalho

\*Cu<sub>2</sub>O-CCE como eletrodo de trabalho

Fonte: Beluomini et al. (104).

A repetibilidade foi avaliada três vezes consecutivas usando o mesmo eletrodo e um RSD de 2,5 % foi obtido. Após o armazenamento do eletrodo à temperatura ambiente (25° C) por 30 dias, ainda foi possível obter 82% da corrente inicial, provando boa estabilidade do material, como mostra a Tabela 8. Essencialmente, esses resultados demonstram que o sensor

proposto neste trabalho apresenta excelente repetibilidade e estabilidade, sendo um método promissor para a análise de mio-inositol.

**Tabela 8** - Estudo da estabilidade do MIP/NiNP/RGO-GCE.

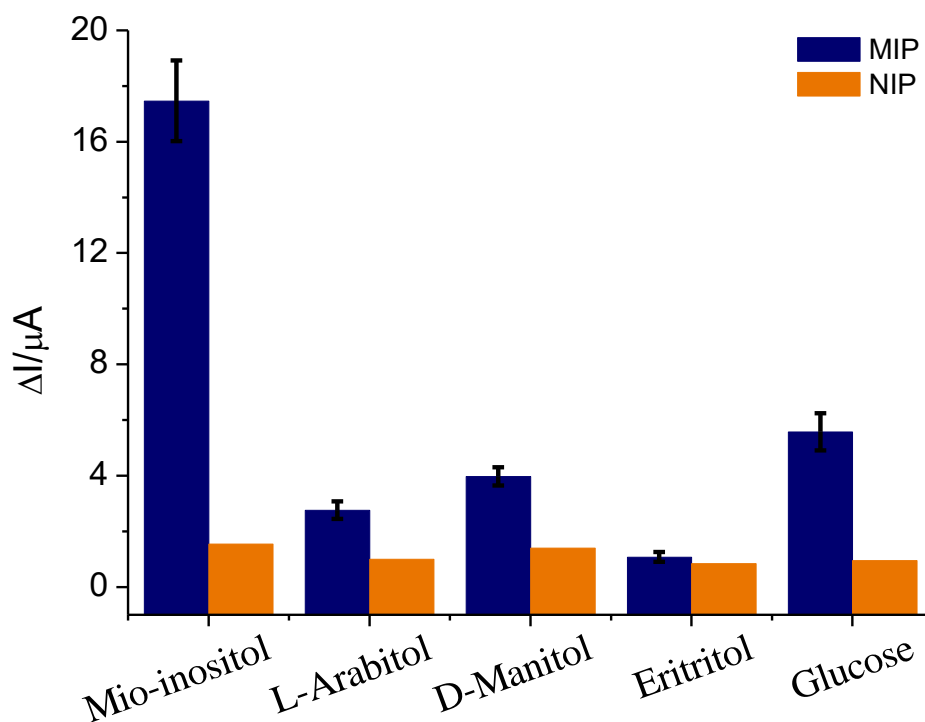
<b>Dia</b>	<b><math>\Delta I / \mu A</math></b>
1°	16,8
10°	16,0
15°	15,9
20°	15,2
30°	13,7

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.3.6 Seletividade do MIP/NiNP/RGO-GCE

A molécula de mio-inositol deve religar-se as cavidades impressas com alta seletividade e afinidade, pois essa é uma das características mais importantes do MIP. Assim, foram escolhidas quatro moléculas com tamanho, estrutura e posição dos grupos hidroxilas semelhantes e que também são encontradas na amostra de vinhaça de cana-de-açúcar em quantidades relevantes, a fim de avaliar a seletividade do sensor. As moléculas selecionadas para este estudo foram: L-arabitol, D-manitol, eritritol e glicose. As mudanças na variação da corrente ( $\Delta I$ ) do par redox  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  na resposta do MIP/NiNP/RGO-GCE e NIP/NiNP/RGO-GCE após contato com a solução de cada uma das moléculas na concentração de  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> em PBS pH 6,0, foram analisadas por DPV, como mostra a Figura 53. Analisando o fator de impressão ( $\alpha$ ) apresentado na Tabela 9, podemos observar que para a molécula de mio-inositol o valor de  $\alpha$  foi de 13,6, enquanto para os possíveis interferentes foi de 2,4, 2,5, 2,0 e 4,1 para L-arabitol, D-manitol, eritritol e glicose, respectivamente. Esses resultados indicam que a religação de mio-inositol nas cavidades do MIP foram mais eficientes em comparação com o NIP, e uma maior seletividade foi observada para a molécula em comparação com as demais ao analisar o fator de seletividade  $\beta$ .

**Figura 53** - Seletividade do MIP/NiNP/RGO-GCE para  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de mio-inositol e possíveis interferentes na mesma concentração.



Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104).

**Tabela 9** - Fator de impressão e fator de seletividade do sensor MIP/NiNP/RGO-GCE para  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de mio-inositol e possíveis interferentes.

Molécula	MIP (μA)	NIP (μA)	$\alpha$	$\beta$
<b>Mio-inositol</b>	19,0	1,4	13,6	1,0
<b>L-arabitol</b>	2,4	1,0	2,4	5,6
<b>D-manitol</b>	3,6	1,4	2,5	5,4
<b>Eritritol</b>	2,0	1,0	2,0	6,8
<b>Glicose</b>	5,0	1,2	4,1	3,3

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.3.7 Determinação da mio-inositol em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar

As amostras de vinhaça foram centrifugadas conforme descrito na Seção 3.12 e posteriormente 5,0 µL da vinhaça filtrada foram adicionadas em 10 mL de PBS pH 6. Nesta solução, concentrações conhecidas do analito foram adicionadas na faixa de  $2,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  a  $6,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  e a curva de adição de padrão foi construída, relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra e o sinal analítico. Todas as medidas foram realizadas em triplicada e em três eletrodos diferentes. A técnica DPV foi utilizada para realizar as medidas e a sonda redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  na concentração de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl foi utilizada na determinação indireta.

Após a construção da curva de adição padrão, por extrapolação da reta até o eixo das abscissas, levando em consideração as diluições, foi encontrada a concentração de  $91 \pm 5,1 \text{ mg}$  de mio-inositol por litro de vinhaça.

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação, adicionando à amostra concentrações conhecidas do analito na faixa de  $2,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  a  $6,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  para testar se a resposta da amostra corresponde ao esperado a partir da curva de calibração. As concentrações recuperadas bem como as porcentagens de recuperação, são mostradas na Tabela 10. Os resultados obtidos se encontram dentro da faixa aceitável de recuperação, variando entre 96 – 103 %. Portanto, o método analítico desenvolvido pode ser considerado adequado para a detecção de mio-inositol em vinhaça de cana-de-açúcar.

Sabendo que a produção estimada de etanol para 2016/2017 no Brasil é de cerca de 30,3 bilhões de litros, cerca de 308,7 bilhões de litros de vinhaça poderão ser produzidos (111). Utilizando o conceito de biorrefinaria, uma recuperação de aproximadamente 2.400 toneladas de mio-inositol seria possível.

**Tabela 10** - Determinação de mio-inositol em vinhaça de cana-de-açúcar (n=3).

<b>Amostra</b>	<b>Quantidade adicionada (10<sup>-10</sup> mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Quantidade detectada (10<sup>-10</sup> mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
	-	7,6 ± 0.5	-	
Vinhaça	2,0	9,7 ± 0.1	101	5,0
	4,0	11,9 ± 0.2	103	4,7
	6,0	13,0 ± 0.2	96	3,6

Fonte: adaptado de Beluomini et al. (104).

#### 4.4 Formação do MIP/3DNEE para determinação de L-arabitol

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos durante o estágio de pesquisa no Departamento de Ciências Moleculares e Nanosistemas da University Ca' Foscari of Venice, Itália, sob supervisão do Prof. Paolo Ugo. Durante o período de 6 meses, o projeto proposto foi desenvolver um conjunto de nanoeletrodos de ouro arranjados tridimensionalmente, 3DNEE, por deposição química em membrana porosa de policarbonato e sobre esses nanoeletrodos realizar a construção do filme polimérico para a formação do MIP juntamente com a molécula de interesse, o L-arabitol. Também será abordada a caracterização eletroquímica e morfológica dos 3DNEE como também do MIP/3DNEE e o desenvolvimento do método analítico para aplicação do sensor na determinação de L-arabitol em vinhaça de cana-de-açúcar.

##### 4.4.1 Construção do NEE

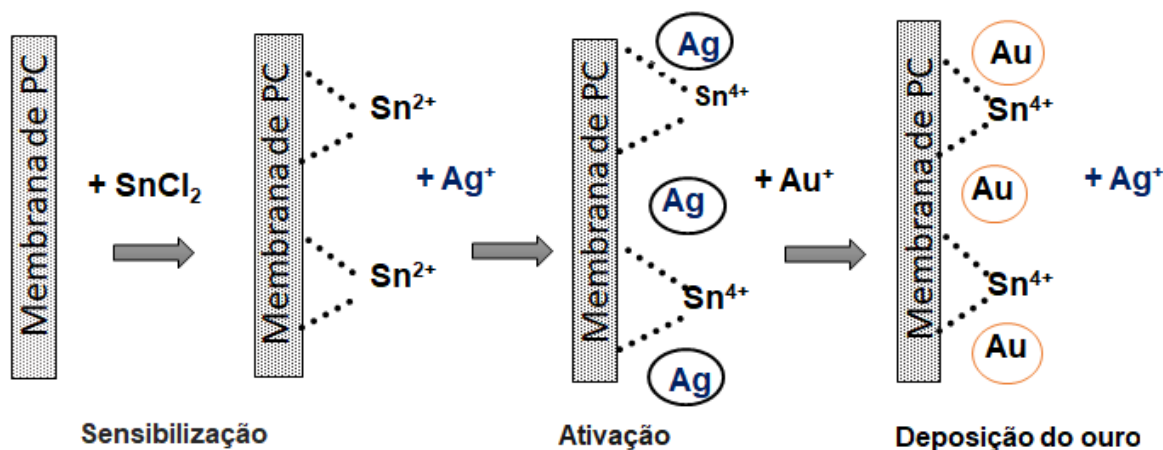
Para a deposição do ouro nos poros da membrana de policarbonato (PC) foi utilizado um agente redutor capaz de depositar o metal em solução para a superfície da membrana através da técnica de deposição química (*electroless*). A vantagem desse método de deposição é que a superfície a ser revestida não precisa ser condutora. Além disso, o fator chave desse tipo de banho está em organizar o processo químico, de modo que, a cinética de transferência homogênea de elétrons do agente redutor para que o íon metálico seja lenta. Isto é essencial porque, de outro modo, o íon metálico poderia ser reduzido na própria solução. Para controlar a deposição do metal e garantir que ele não reduza antes do previsto, um catalisador é aplicado diretamente na superfície a ser revestida.

O processo de deposição química é mostrado esquematicamente na Figura 54. Inicialmente, a membrana de PC foi imersa em metanol por 4 h e depois colocada em contato com um derivatizador,  $\text{Sn}^{2+}$ , através da imersão em uma solução contendo  $0,026 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{SnCl}_2$  e  $0,07 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido trifluoroacético, sendo o solvente metanol-água 50:50, por 45 min. A membrana de PC é coberta por uma camada de PVP (polivinilpirrolidona) durante sua fabricação e quando é colocada em contato com o metanol ela se torna mais hidrofílica e através dos grupos aminas e carboxílico presentes no PVP, o íon  $\text{Sn}^{2+}$  é capaz de se ligar a superfície da membrana.

Após a sensibilização com  $\text{Sn}^{2+}$ , a membrana foi ativada por imersão em solução de  $0,026 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Ag}[(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3]$  por 10 min. Esse processo causa uma reação redox em que o  $\text{Sn}^{2+}$  ligado a superfície é oxidado a  $\text{Sn}^{4+}$  e a  $\text{Ag}^+$  da solução é reduzida para Ag. Como

resultado, as paredes dos poros e das faces da membrana ficaram revestidas com nanopartículas de Ag. Após a deposição da Ag, a membrana foi enxaguada duas vezes com metanol e em seguida com água deionizada.

**Figura 54** - Processo *electroless* usado para a deposição de ouro nos poros da membrana de policarbonato.



Fonte: elaborado pelo autor

A membrana coberta por Ag foi então imersa em um banho de ouro contendo  $7,9 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_3\text{Au}(\text{SO}_3)_2$  em  $0,127$  mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a  $0^\circ\text{C}$ . Após 20 min,  $0,625$  mol  $\text{L}^{-1}$  de formaldeído foi adicionado à solução. O processo de *electroless* ocorreu por um período de 24 h. Durante esse processo, as partículas de Ag são deslocadas galvanicamente pelo Au, uma vez que o ouro é um metal mais nobre. Como resultado, as paredes e os poros da membrana foram revestidas com partículas de Au. Essas partículas são excelentes sítios catalíticos para a oxidação do formaldeído e concomitante redução de  $\text{Au}^+$  para  $\text{Au}^0$ . Assim, o preenchimento dos poros com ouro é efetivamente realizado. Esta reação pode ser representada pela Equação 10.



Após as 24 h, a membrana foi removida do banho de ouro e imersa em  $\text{HNO}_3$  25 % durante 12 horas para remoção dos produtos químicos adsorvidos na superfície. Em seguida, foi enxaguada com água deionizada e pronta para ser utilizada.

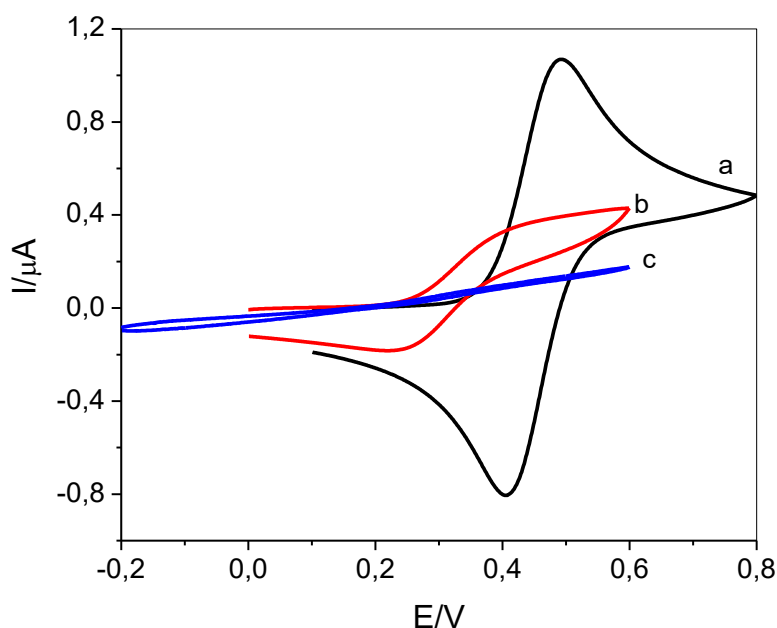
A montagem dos eletrodos foi realizada como descrito na seção experimental 3.9.

#### 4.4.2 Comportamento eletroquímico do NEE

Inicialmente o comportamento eletroquímico do conjunto de nanoeletrodos, NEE, foi analisado em diferentes sondas redox por voltametria cíclica, sendo elas: ferroceno carboxilato (FcCOOH), (ferrocenilmetil)trimetilamonio ( $FA^+$ ) e ferricianeto/ferrocianeto de potássio ( $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ), preparadas na concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $KNO_3$ . Os CVs comparativos de cada um são mostrados na Figura 55. Como podemos observar, a sonda  $FA^+$  apresentou o melhor perfil voltamétrico, com separação de pico ( $\Delta E_p$ ) de 63,0 mV e  $I_{pa}/I_{pc}$  de 0,99, sugerindo um comportamento reversível. O perfil voltamétrico do par redox  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  apresentou um  $\Delta E_p$  de 180 mV e uma razão  $I_{pa}/I_{pc}$  de 0,73 e um comportamento quase-irreversível. O FcCOOH praticamente não apresentou corrente de oxidação/redução. Esses resultados mostram que o NEE é sensível a cinéticas mais lentas, uma vez que esses nanoeletrodos se comportam como eletrodos com superfície parcialmente bloqueada, operando em sobreposição total da camada de difusão (*overlap*), assim a verdadeira constante cinética heterogênea é substituída por uma aparente, sendo esta última menor devido à área do eletrodo ser fracionada (relação entre área ativa e geométrica) (112). Assim,  $FA^+$  foi escolhido como sonda redox, solúvel em água e caracterizada por ter uma cinética heterogênea de transferência de elétrons rápida.

Devido a seu comportamento diferenciado, o conjunto de nanoeletrodos pode apresentar algumas limitações em relação ao seu uso como sensores com superfícies funcionalizadas. Isso se deve ao fato de que imobilizando agentes químicos na sua superfície, é necessário considerar o seu baixo valor de área ativa, que pode ser de 102 a 103 vezes menor que a área geométrica total (58).

**Figura 55-** Voltamogramas cíclicos para diferentes sondas redox em NEE. Sendo (a)  $\text{FA}^+$  (b)  $\text{FcCOOH}$ , (c)  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-4-}$  na concentração de  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ ,  $\nu = 50 \text{ mV s}$



Fonte: elaborado pelo autor

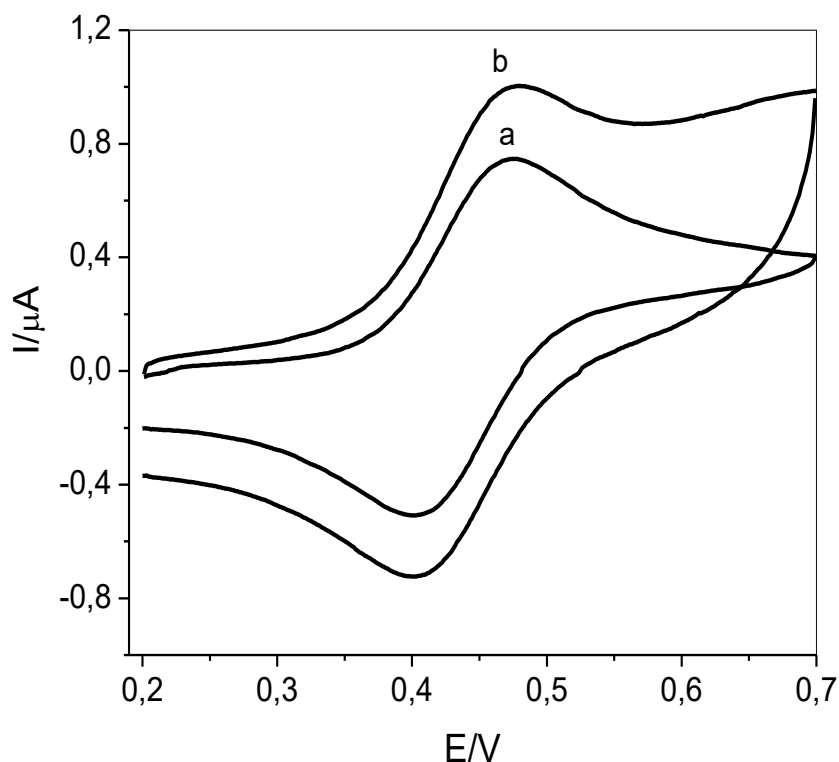
#### 4.4.3 Formação do 3DNEE

Para aumentar a pequena área ativa do NEE, o processo de degradação controlada da membrana de PC pode ser realizado de modo a remover parcialmente as camadas superiores da membrana. Esse processo é feito por meio da imersão do eletrodo na mistura dos solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  por um tempo determinado (*etching process*), tornando o conjunto de nanoeletrodos que antes era de uma estrutura plana 2D para uma 3D.

A Figura 56 faz uma comparação por meio dos voltamogramas cíclicos do comportamento do  $\text{FA}^+$  em NEE (curva a) e 3DNEE (curva b). Observando os voltamogramas podemos observar um incremento da corrente capacitiva, associado ao carregamento da dupla camada elétrica, conforme descrito pela Equação 11, que correlaciona este parâmetro com a área ativa do NEE, onde  $C_{dl}$  é a capacitância da dupla camada do ouro e  $\nu$  é a velocidade de varredura. A Tabela 11 mostra os valores referentes a corrente capacitiva ( $I_c$ ) e faradaica ( $I_f$ ) para NEE e 3DNEE.

$$I_c = \nu C_{dl} A_{act} \quad (\text{Equação 11})$$

**Figura 56** - Voltamograma cíclico para FA<sup>+</sup> na concentração de  $1.0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em  $5.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>, em (a) NEE e (b) 3DNEE,  $v = 50$  mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: elaborado pelo autor.

**Tabela 11** - Comparação entre a corrente faradaica e capacitiva do NEE e 3DNEE.

Corrente	NEE	3DNEE
$I_f$ / nA	480	530
$I_c$ / nA	20	60

Fonte: elaborado pelo autor

Analisando a tabela podemos observar que o aumento da corrente faradaica é muito pequeno, isso porque para uma espécie redox de cinética rápida a corrente faradaica é controlada por uma difusão linear (total sobreposição), de modo que permanece proporcional à área geométrica total do conjunto, independente da exposição dos nanofios. Vale ressaltar que para fins eletroanalíticos, a principal vantagem da total sobreposição das camadas de difusão é o limite de detecção melhorado em comparação com eletrodos convencionais com a mesma

área de superfície. Isso ocorre porque para 3DNEE, operando em condições de total sobreposição das camadas de difusão, a corrente faradaica é proporcional à área geométrica total do conjunto exposto à solução ( $A_{geom} = \text{área do nanodisco} + \text{isolante}$ ), enquanto a corrente capacitiva da dupla camada, que é o principal componente do ruído na eletroanalítica, é proporcional apenas a área do nanodisco (113).

Logo, os 3DNEEs são poderosos sistemas de eletrodos que como mostrado, possuem uma elevada área ativa quando comparados aos demais nanoeletrodos, sendo adequado para a funcionalização.

#### 4.4.4 Formação do MIP/3DNEE

Como vimos, o 3DNEE possui uma elevada área ativa sendo considerado um conjunto de nanoeletrodos promissor para a formação do MIP. Além desta característica, a superfície deve proporcionar uma boa adesão para o filme e estar diretamente relacionado com a sensibilidade do sensor.

Assim, a fim de verificar o efeito do tempo de exposição dos nanofios durante o processo de eletropolimerização, os tempos de 2 s, 10 s e 30 s de degradação da membrana de policarbonato (*etching*), foram feitos em uma solução de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  1:9 (v/v). Após isso, o eletrodo foi colocado em estufa a  $150^\circ\text{C}$  para selar os possíveis espaços entre a membrana de PC e os nanoeletrodos, pois essas lacunas podem elevar a corrente capacitiva.

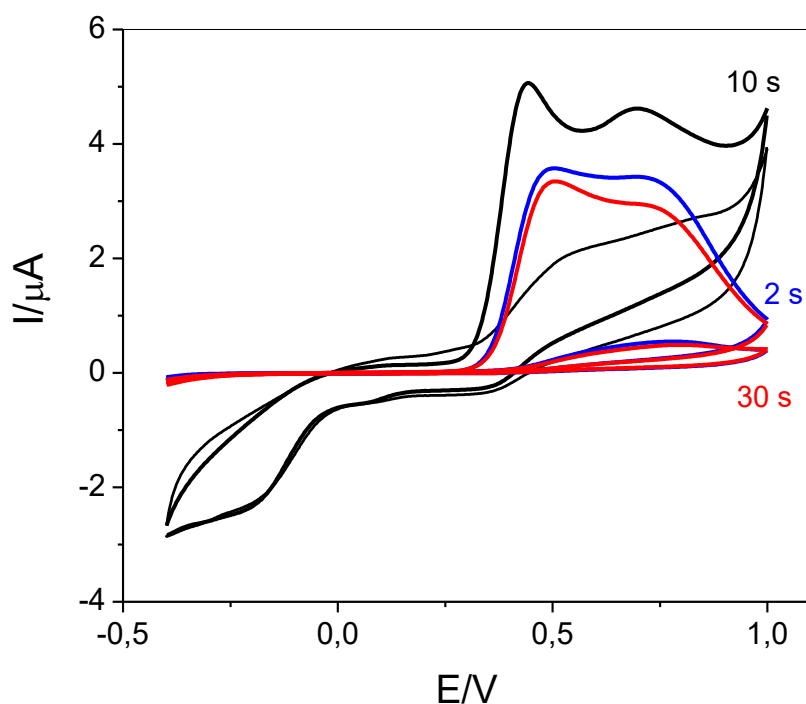
Após isso, os nanoeletrodos foram colocados em solução para eletropolimerização por CV na faixa de -0,40 a 1,0 V, por 25 ciclos a uma velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , em uma solução contendo  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de o-PD e  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de L-arabitol em solução tampão acetato pH 4,8.

Durante o processo de eletropolimerização, o oxigênio das moléculas de L-arabitol pode interagir com o hidrogênio do grupo amino do polímero através de ligações de hidrogênio. Essa interação define a forma, tamanho e orientação dos grupos funcionais durante o processo de impressão molecular, que após a remoção da molécula é capaz de criar cavidades específicas para o L-arabitol.

A Figura 57 mostra os dois primeiros ciclos de eletropolimerização em 3DNEE com *etching* de 2, 10 e 30 s. Dois picos de oxidação são observados na varredura de potencial positivo, relacionado à oxidação da o-PD. Na região negativa foi observado apenas um pico para o eletrodo com 10 s de *etching* e está relacionado ao processo de transferência de elétrons acoplado à troca de prótons entre o filme o-PD e a solução, possivelmente relacionada à

mudança estrutural do filme (114). A corrente de pico para o 3DNEE com 10 s de *etching* foi significativamente maior do que o 3DNEE com 2 s e 30 s. A diferença de corrente entre o primeiro e segundo ciclo durante a eletropolimerização é causada pela formação de uma película não condutora do filme de o-PD. A relação entre a corrente de pico do segundo para o primeiro ciclo nos tempos de 2 s, 10 s e 30 s foram de 87,4 %, 46,7 % e 98,5 %, respectivamente. Esta diferença mostra que o 3DNEE exposto no tempo de 10 s de *etching*, provavelmente tem uma área ativa maior em comparação com os demais tempos. Assim, para dar prosseguimento aos estudos de formação do MIP sobre os 3DNEE, a exposição dos nanofios foi realizada no tempo de 10 s.

**Figura 57** - Voltamogramas cíclicos dos dois primeiros ciclos da eletropolimerização de o-PD em 3DNEE com tempos de *etching* de 2 s, 10 s e 30 s, em solução contendo  $2,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de o-PD e  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de L-arabitol em meio de tampão acetato pH 4,8,  $v = 50$  mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido à fraca atividade da molécula de L-arabitol na faixa de pH necessária para o funcionamento adequado do MIP, uma vez que o processo de transferência de carga e estabilidade do polímero é melhor em pH inferior a 7,0 e a oxidação direta da molécula de L-arabitol ocorrer em pH acima de 9, a solução de FA<sup>+</sup> foi utilizada como sonda redox para avaliar o desempenho do sensor. Como já relatado nos estudos anteriores, a sonda eletroquímica

é capaz de atingir a superfície do eletrodo através das cavidades impressas no polímero, que formam um percurso por onde a sonda pode se difundir. Quando o sensor entra em contato com uma solução contendo moléculas de L-arabitol, elas podem se religar nessas cavidades e assim bloquear a chegada da sonda, impedindo a transferência de elétrons. Conseqüentemente, o sinal eletroquímico diminui proporcionalmente à quantidade de moléculas de L-arabitol que estão se religando. A variação da corrente ( $\Delta I$ ) foi calculada com base nas correntes de pico de oxidação obtidas antes e após a religação do L-arabitol. Assim, todos os experimentos eletroquímicos foram realizados em solução de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de FA<sup>+</sup> em meio de  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>.

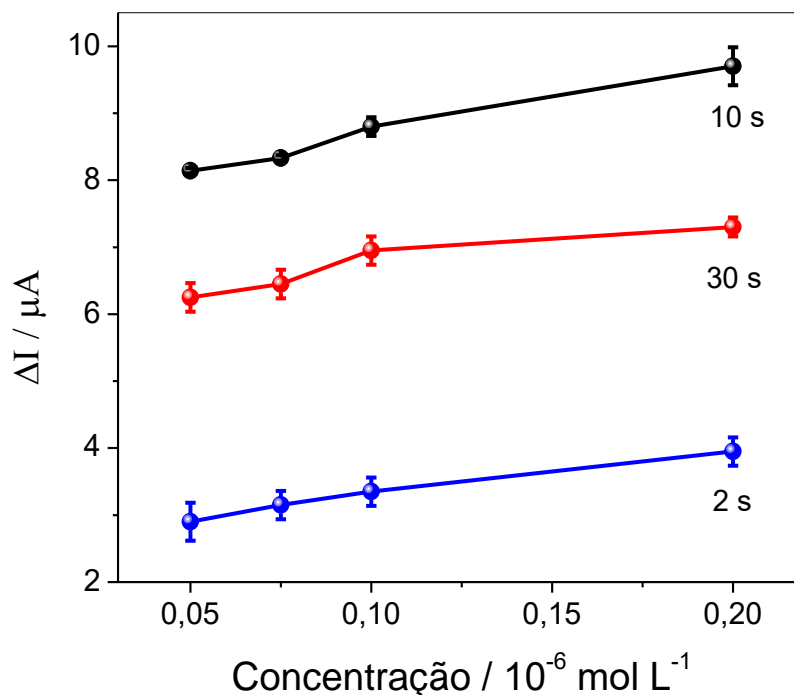
#### 4.4.5 Resposta do sensor em eletrodos com diferentes tempos de exposição dos nanofios

Sabendo que a superfície para a formação do MIP está relacionada com a sensibilidade do sensor, a influência de diferentes tempos para a exposição dos nanofios (*etching*) na formação do 3DNEE foram estudados após a formação do MIP sobre essa estrutura. Assim, após a eletropolimerização em 3DNEE feitos com 2 s, 10 s e 30 s, o MIP/3DNEE foi colocado em solução de etanol 70 % por 1 min para a formação das cavidades. Após esse procedimento, o eletrodo foi imerso em diferentes concentrações de L-arabitol preparadas em solução de PBS pH 6,5 por 20 min, para que a religação das moléculas nas cavidades formadas fosse realizada. Após isso, o MIP/3DNEE foi colocado em solução contendo FA<sup>+</sup> e por DPV foi avaliada a sensibilidade.

A sensibilidade do MIP/3DNEE foi melhor após 10 s de *etching* provavelmente devido ao aumento da área eletroativa do NEE, que é capaz de expor os nanofios sem danificar a estrutura do nanoeletrodo. Assim, neste tempo há um aumento na extensão da eletropolimerização e conseqüentemente um aumento no número de locais disponíveis para a formação da impressão molecular. Como resultado, são formadas mais cavidades para o reconhecimento do L-arabitol. O tempo de 2 s de *etching* foi insuficiente para expor satisfatoriamente os nanofios e, assim, menos locais ficaram disponíveis para eletropolimerização. Já o tempo de 30 s de *etching*, parece ter sido excessivo, prejudicando a estrutura da membrana de policarbonato e comprometendo a formação dos nanofios arranjados tridimensionalmente, reduzindo, o desempenho do sensor como mostra a Figura 58.

Analisando os dados, o tempo de *etching* de 10 s foi confirmado como o tempo ideal para a formação do MIP/3DNEE, sendo usado nos estudos seguintes.

**Figura 58** -Variação da corrente em diferentes concentrações de L-arabitol para MIP/3DNEE, com 3DNEE feito em 2, 10 e 30 s de etching.



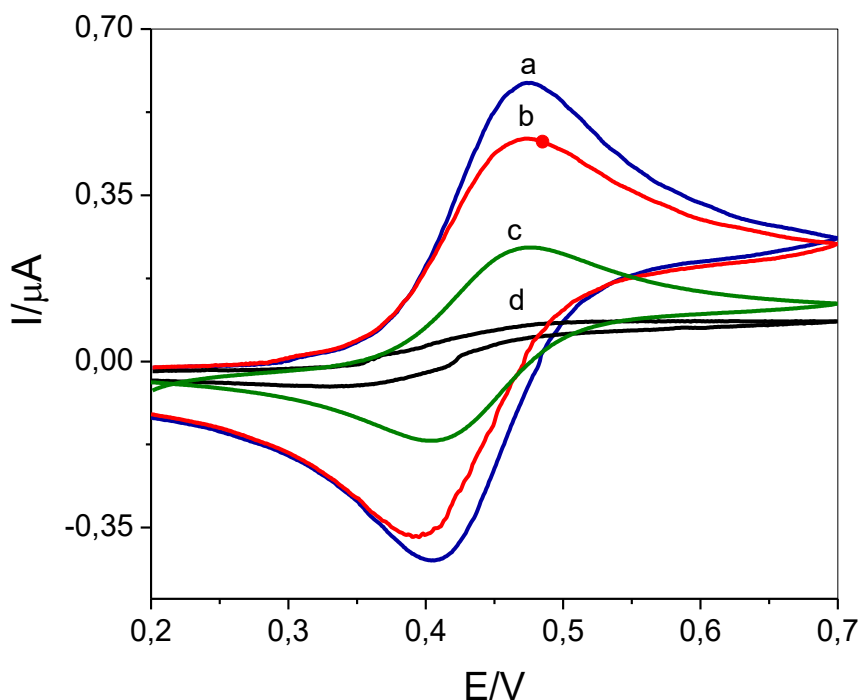
Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4.6 Comportamento eletroquímico do MIP/3DNEE

A CV é uma técnica amplamente utilizada para monitorar os processos de modificação dos eletrodos. A Figura 59 mostra os resultados da modificação do 3DNEE para a formação MIP/3DNEE. No voltamograma da curva a é possível observar a formação do pico redox reversível para o 3DNEE. Após a modificação dos nanoeletrodos para a formação do MIP (curva d) a corrente de pico diminui devido a formação do filme não-condutor na superfície do 3DNEE. Quando o MIP/3DNEE foi colocado em solução para remoção da molécula molde e formação das cavidades impressas a resposta do sensor aumenta (curva b). Assim, por essas cavidades é possível que a sonda redox atinga a superfície do 3DNEE. Para verificar se as cavidades impressas eram capazes de reconhecer a molécula de L-arabitol, o MIP/3DNEE foi colocado em solução contendo L-arabitol por 20 min para que as moléculas se religassem nas suas cavidades complementares. Na curva c, esse fenômeno foi observado como a diminuição da corrente de pico, revelando que algumas cavidades foram recombinadas com o L-arabitol, dificultando a chegada da sonda à superfície do 3DNEE.

**Figura 59** – Voltamogramas cíclicos para (a) 3DNEE (b) MIP/3DNEE após a remoção do modelo, (c) MIP/3DNEE após 30 minutos de religação em  $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de L-arabitol (d) 3DNEE após a eletropolimerização. Todas as medições foram realizadas em solução contendo  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{FA}^+$  em  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ ,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Fonte:



elaborado pelo autor.

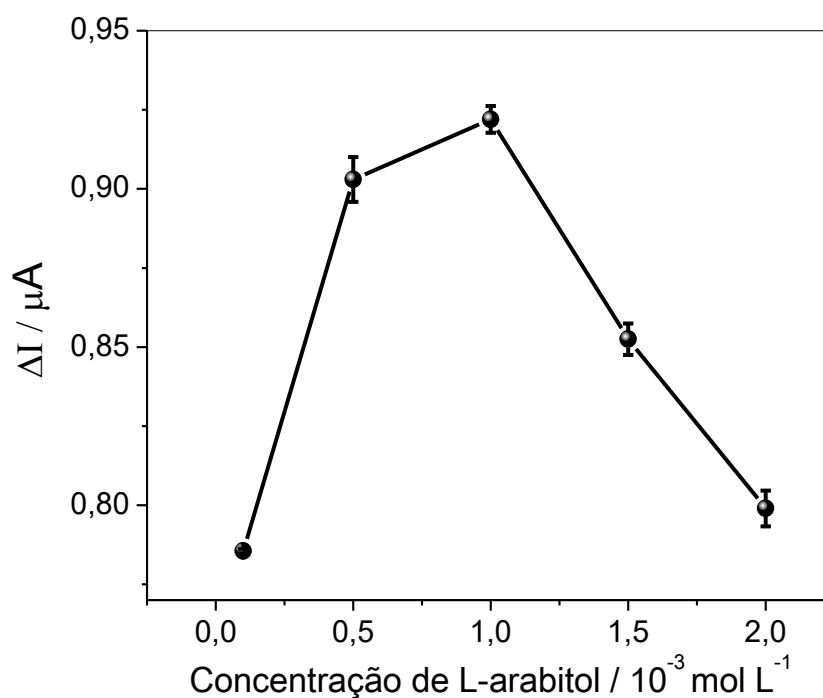
#### 4.4.7 Estudo dos parâmetros que influenciam a formação do MIP/3DNEE

Como já estabelecido anteriormente, alguns parâmetros influenciam diretamente a formação do MIP, afetando sua sensibilidade, seletividade e robustez. Assim, alguns desses parâmetros foram avaliados na construção do MIP/3DNEE tais como, concentração da molécula de L-arabitol, número de ciclos na eletropolimerização, tempo de extração da molécula para a formação das cavidades impressas e o tempo de religação da molécula nas cavidades formadas. Cada um desses parâmetros foram estudados por DPV, tendo como sonda redox  $\text{FA}^+$  e os resultados são discutidos a seguir.

#### 4.4.7.1 Efeito da concentração do L-arabitol

A concentração de L-arabitol na solução de eletropolimerização está diretamente relacionada à quantidade de cavidades que serão formadas no MIP e afeta diretamente a sensibilidade e seletividade do sensor. Assim, a concentração do monômero o-PD para moldar a molécula foi mantida constante em  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  enquanto que a concentração de L-arabitol foi estudada na faixa de  $0,5$  a  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , as soluções foram preparadas em meio de tampão acetato pH 4,8. Analisando a Figura 60, verifica-se que a concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de L-arabitol apresenta maior variação de corrente ( $\Delta I$ ) para a oxidação do  $\text{FA}^+$ . Quando as concentrações de L-arabitol foram menores, a resposta do sensor também foi menor, provavelmente devido a pequena quantidade de moléculas para a formação das cavidades. Por outro lado, quando a concentração foi maior que  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , além de tornar a extração mais difícil, a probabilidade das moléculas de se aglomerarem foram maiores, gerando cavidades não seletivas. Portanto, a concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de L-arabitol foi considerada ideal para a continuação dos estudos.

**Figura 60** - Efeito da concentração de L-arabitol durante a eletropolimerização com o-PD na resposta do MIP/3DNEE na presença de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{FA}^+$  em  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ .

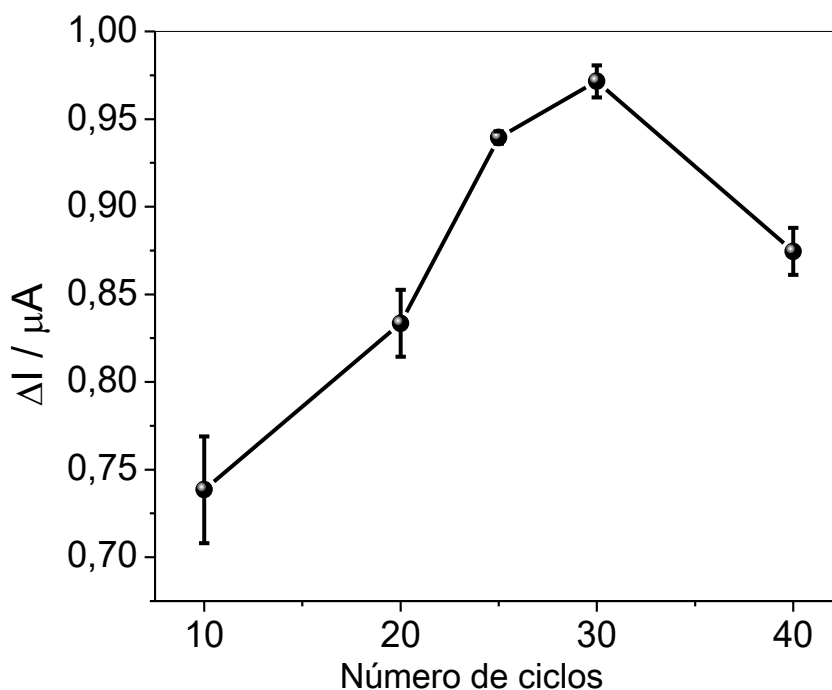


Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4.7.2 Efeito do número de ciclos na eletropolimerização

O número de ciclos durante a eletropolimerização de o-PD na presença de L-arabitol pode afetar a espessura do filme formado sobre o 3DNEE e comprometer a sensibilidade. Assim, este parâmetro foi estudado na faixa de 10 a 40 ciclos durante a preparação do MIP (Figura 61). Observou-se que a variação da corrente de pico da sonda redox foi crescente com o aumento do número de ciclos até a resposta máxima no 30º ciclo. Após isso, o  $\Delta I$  diminuiu, provavelmente devido ao aumento da espessura do filme, que dificulta a extração das moléculas de L-arabitol da matriz polimérica, reduzindo a eficiência do sensor. Além disso, filmes muito espessos podem dificultar a transferência de massa e diminuir a sensibilidade do sensor. Por outro lado, filmes muito finos, produzidos abaixo de 30 ciclos, apresentaram pouco recobrimento da superfície e baixa capacidade de reconhecimento molecular. Assim, o número de ciclos ótimo para a eletropolimerização de o-PD com L-arabitol em 3DNEE foi de 30 ciclos.

**Figura 61** - Influência do número de ciclos durante a eletropolimerização de o-PD com L-arabitol. A variação da resposta foi analisada por DPV na presença de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de FA<sup>+</sup> em  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>.



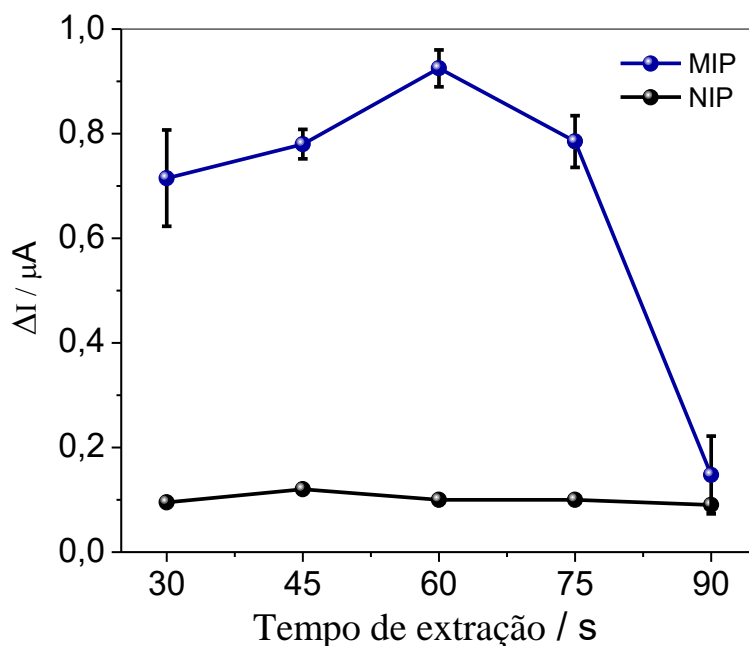
Fonte: elaborado pelo autor.

#### *4.4.7.3 Efeito do tempo de extração do L-arabitol na formação das cavidades*

Após a eletropolimerização, as moléculas de L-arabitol são presas na matriz do polímero devido as interações de hidrogênio. Para a remoção, vários métodos foram testados e assim como para a extração do D-manitol, o uso de solvente foi o mais eficaz no caso da o-PD, provavelmente porque o solvente é capaz de interagir com o polímero, liberando a molécula de L-arabitol. Para isso, alguns solventes foram estudados, tais como, metanol, etanol, água, tampão de fosfato, ácido acético, acetonitrila e água/etanol em diversas proporções.

Uma vez que o 3DNEE é formado por uma membrana de PC, o uso de alguns solventes orgânicos torna-se inviável, como por exemplo a acetonitrila, pois pode danificar sua estrutura. Assim, de todos os solventes testados (acetonitrila, ácido acético, água e metanol) o etanol foi capaz de extrair a molécula completamente e em um curto período de tempo, sem danificar a estrutura de PC quando usado na concentração de 70 % (v/v). Para otimizar o tempo de permanência do MIP/3DNEE em contanto com essa solução para que a extração seja completa, foram testados os tempos de 30 a 90 s. Como pode ser visto na Figura 62, o tempo de 60 s proporcionou uma maior resposta do sensor, sendo considerado o tempo ótimo para a extração da molécula. Um sensor não impresso também foi desenvolvido nas mesmas condições, porém sem a molécula de L-arabitol, a fim de verificar a eficiência da extração.

**Figura 62** - Efeito do tempo de extração na resposta do MIP/3DNEE e NIP/3DNEE por DPV na presença de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{FA}^+$  em  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ .

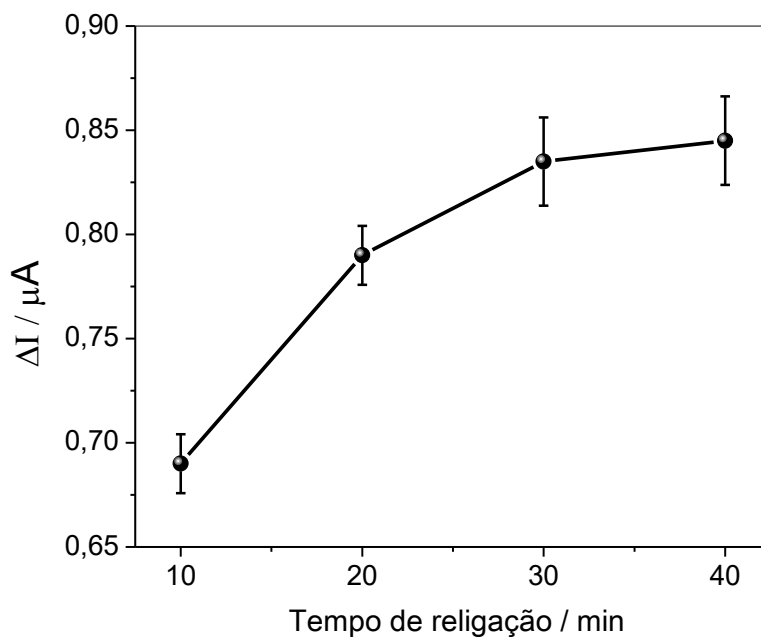


Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4.7.4 Efeito do tempo na religação da molécula de L-arabitol

O efeito do tempo necessário para que a molécula de L-arabitol ( na concentração de  $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ) seja religada nas cavidades formadas na matriz polimérica foi investigado na faixa de 10 a 40 min, em solução tampão fosfato pH 6,5 à temperatura ambiente, como mostra na Figura 63. Analisando esta figura podemos observar que o  $\Delta I$  aumentou gradualmente até permanecer estável após 30 min, indicando que um equilíbrio na adsorção foi alcançado, permanecendo praticamente inalterado em tempos superiores. Assim, o tempo de 30 min foi selecionado como o tempo ideal para que a molécula de L-arabitol seja recombinada nas suas cavidades complementares

**Figura 63** - Efeito do tempo de religação da molécula de L-arabitol na resposta do sensor MIP/3DNEE por DPV na presença de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{FA}^+$  em  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ .

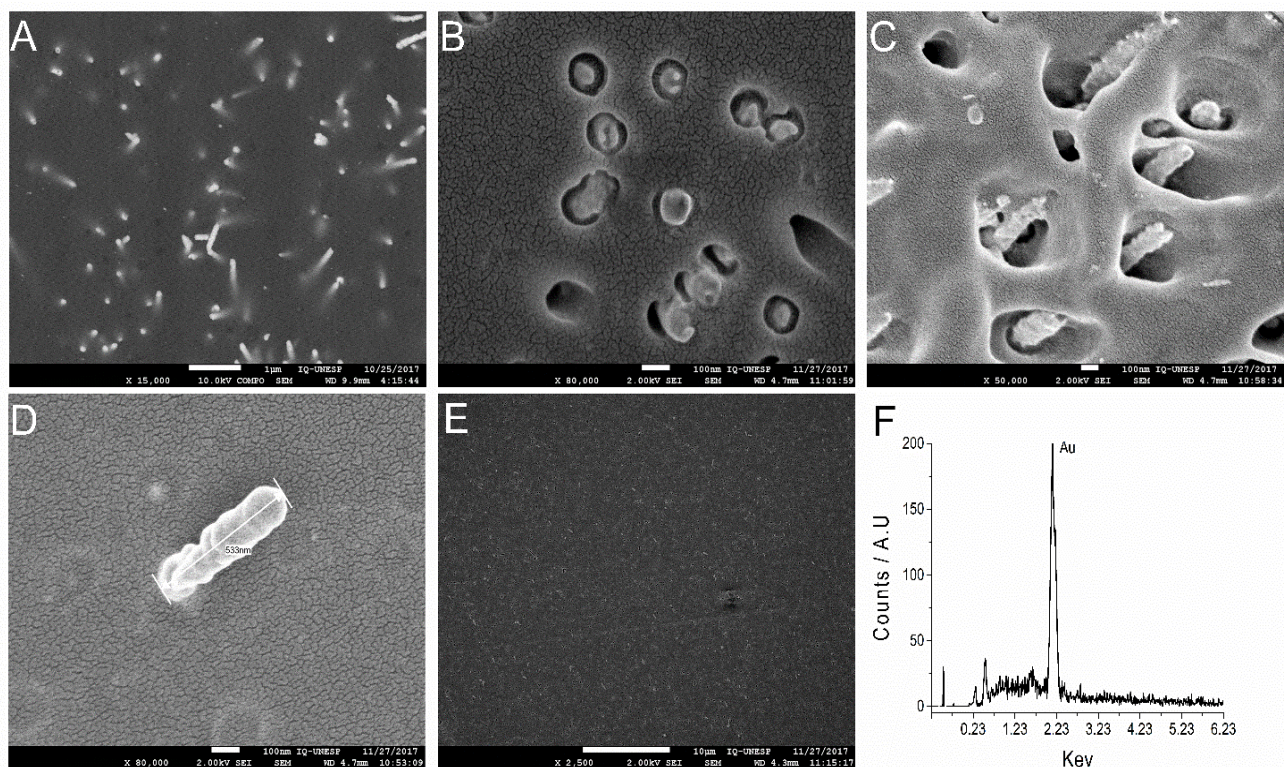


Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.4.8 Caracterização do NEE, 3DNEE e MIP/3DNEE

A caracterização morfológica do NEE, 3DNEE e MIP/3DNEE foi realizada por meio das imagens de MEV. Como pode ser visto na Figura 64 – A, os NEE são distribuídos homogeneamente sobre a membrana de policarbonato, na Figura 64 – B é possível ver com maior magnitude a formação dos nanofios de ouro embutidos nos poros da membrana. Após o processo de *etching*, foi obtida uma estrutura homogênea e tridimensional como mostra a Figura 64- C, resultando em um aumento na área ativa. O comprimento de cada 3DNEE foi de cerca de 533 nm, como mostra a Figura 64 – D. Após o processo de eletropolimerização, a formação do MIP/3DNEE é mostrada na Figura 64 – E, em que o polímero recobre a superfície do 3DNEE. A composição química do 3DNEE foi analisada por EDS, Figura 64 – F, provando que os nanofios formados são de ouro.

**Figura 64** - Imagens de MEV para (A) e (B) NEE, (C) 3DNEE, (D) tamanho de um nanofio para 3DNEE, (E) MIP/3DNEE e (F) análise de EDS.

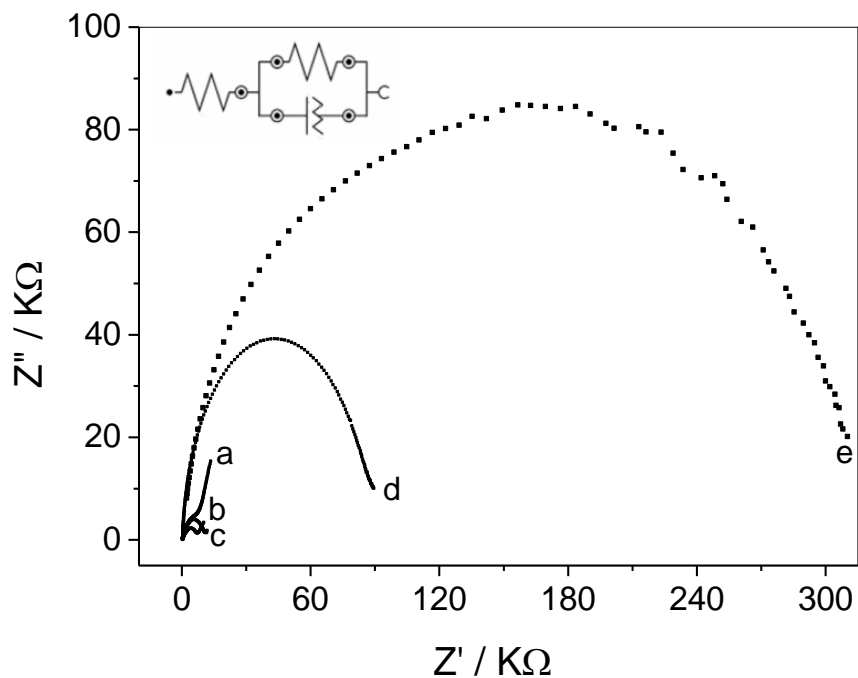


Fonte: elaborado pelo autor.

Os processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/solução foram estudados por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Os resultados da EIS são mostrados na Figura 65 na forma de diagrama de Nyquist. O gráfico de Nyquist inclui uma parte semicircular relacionada ao processo de transferência de elétrons, que controla a cinética da transferência de elétrons da solução para a superfície do eletrodo. A parte linear corresponde a baixas frequências e está relacionada ao processo eletroquímico de difusão limitada (88). A resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ) foi obtida a partir do circuito equivalente (mostrado na inserção superior da Figura 65), que simula as características isolantes e dielétricas da interface eletrodo/solução. Os valores de  $R_{ct}$  para 2DNEE (curva b) foram de 7,9  $K\Omega$  e para 3DNEE (curva a) de 3,8  $K\Omega$ , mostrando que a formação do conjunto de nanoeletródos tridimensional facilita a transferência de elétrons. Após a eletropolimerização para a formação de MIP/3DNEE (curva e), o valor de  $R_{ct}$  aumenta para 168  $K\Omega$ , provavelmente devido à formação do filme o-PD não-condutor na superfície do sensor. Quando as moléculas de L-arabitol são removidas das cavidades formadas no MIP/3DNEE, a resistência diminui para 11,3  $K\Omega$  (curva c),

sugerindo a formação bem sucedida das cavidades, por onde a sonda redox é capaz de alcançar a superfície do 3DNEE. Quando o sensor é colocado em solução contendo moléculas de L-arabitol, essas moléculas são capazes de se religar nas cavidades formadas, ocorrendo um bloqueio parcial da superfície. Como resultado, o valor  $R_{ct}$  aumenta para  $75,3 \text{ K}\Omega$  (curva d).

**Figura 65** - Diagrama de Nyquist para 2DNEE (curva b), 3DNEE (curva a), MIP/3DNEE (curva e) e MIP/3DNEE antes (curva c) e após (curva d) religação das moléculas de L-arabitol. Na inserção superior direita está o circuito equivalente.



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4.9 Estudo da isoterma de ligação

As propriedades de adsorção do analito nas cavidades do MIP foram analisadas utilizando o modelo de isotérma de Langmuir, que fornece medidas das propriedades de ligação no comportamento de reconhecimento molecular dependendo da concentração da molécula de interesse em um sistema. De modo geral, a concentração do analito ligado nas cavidades do MIP aumenta conforme a concentração do analito livre também aumenta. Quando o polímero está saturado e todos os locais de reconhecimento estão ocupados, a concentração do analito é nivelada e permanece praticamente constante. Assim, um modelo de ligação específica de uma determinada relação entre as concentrações de analito ligado e livre, pode ser usado para simular a isoterma de ligação (115).

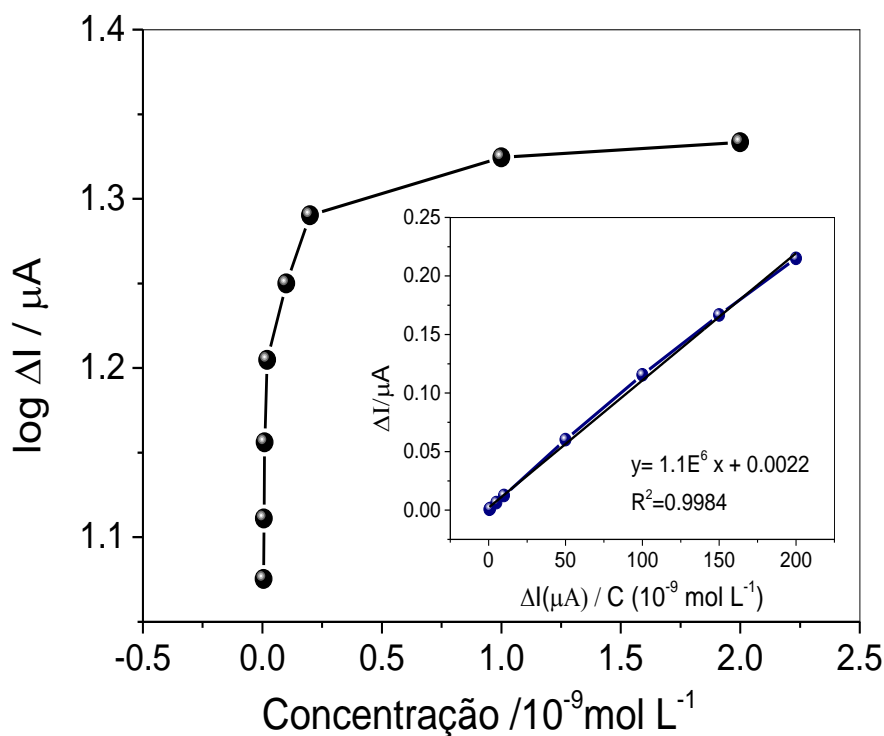
O gráfico da Figura 66 mostra uma isoterma de ligação para o MIP/3DNEE em diferentes concentrações de L-arabitol ( $5,0 \times 10^{-10} - 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ). É possível observar a dependência logarítmica da corrente ( $\Delta I$ ) com a concentração ( $C$ ) até a formação do platô, que ocorre devido à saturação dos locais de ligação do MIP.

Por aplicação da isoterma de Langmuir (116), o parâmetro de equilíbrio, dado pela constante de dissociação ( $K_d$ ), pode ser calculado a partir da Equação 12:

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{\max} K_d C}{1 + K_d C} \quad (\text{Equação 12})$$

Com o rearranjo da equação, é possível relacionar  $\Delta I$  versus  $\Delta I/C$  e obter uma relação linear com inclinação de  $1/K_d$  (inserte da Figura 66). Assim, o valor de  $K_d$  encontrado foi de  $9,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , sugerindo que uma grande afinidade das moléculas de L-arabitol pelas cavidades formadas.

**Figura 66** - Curva logarítmica de  $\Delta I$  pela concentração de L-arabitol e inserção da isoterma de adsorção de Langmuir para MIP/3DNEE.

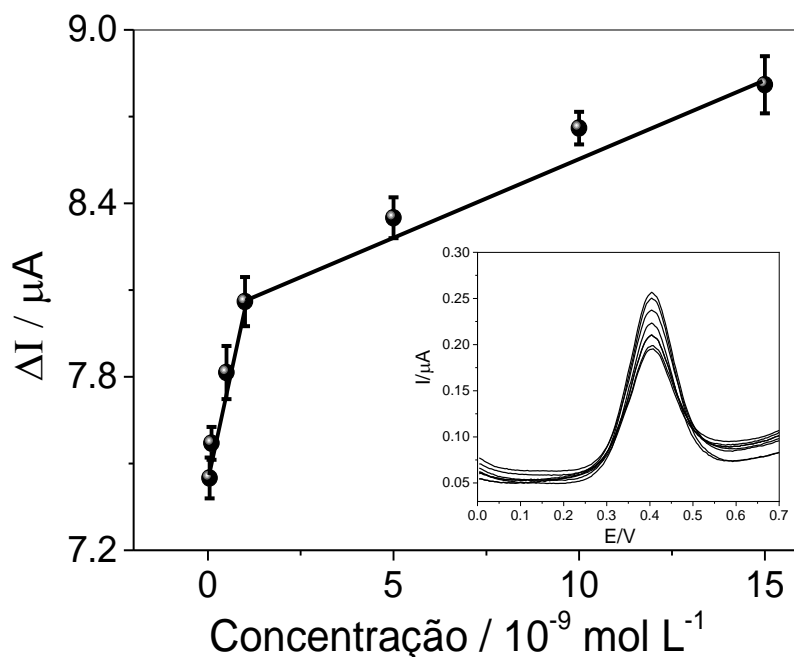


Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4.10 Desempenho analítico

O desempenho analítico do MIP/3DNEE foi avaliado por DPV antes e após a religação de diferentes concentrações de L-arabitol como mostra a Figura 67. O pico de corrente diminuiu com o aumento da concentração de L-arabitol, sugerindo que algumas cavidades foram recombinadas pelas moléculas, causando um bloqueio parcial na transferência de carga da sonda redox. A curva analítica entre a corrente de pico e a concentração de L-arabitol foi linear em duas faixas:  $1,0 \times 10^{-9} - 1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1} - 1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . O primeiro intervalo foi utilizado para calcular os valores das figuras de mérito. A equação linear foi  $I (\mu A) = 5,5 \times 10^7 C_{L\text{-arabitol}} + 7,5$ , com coeficiente de correlação de 0,996. O limite de detecção foi de  $7,7 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  e o limite de quantificação de  $2,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ . A sensibilidade amperométrica (Sa) foi de  $5.1 \text{ A L mol}^{-1}$ .

**Figura 67** - Resposta do MIP/3DNEE em DPV em diferentes concentrações de L-arabitol ( $1,0 \times 10^{-9}$  -  $1,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>), utilizando como sonda redox uma solução de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de FA<sup>+</sup> preparado em  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>.

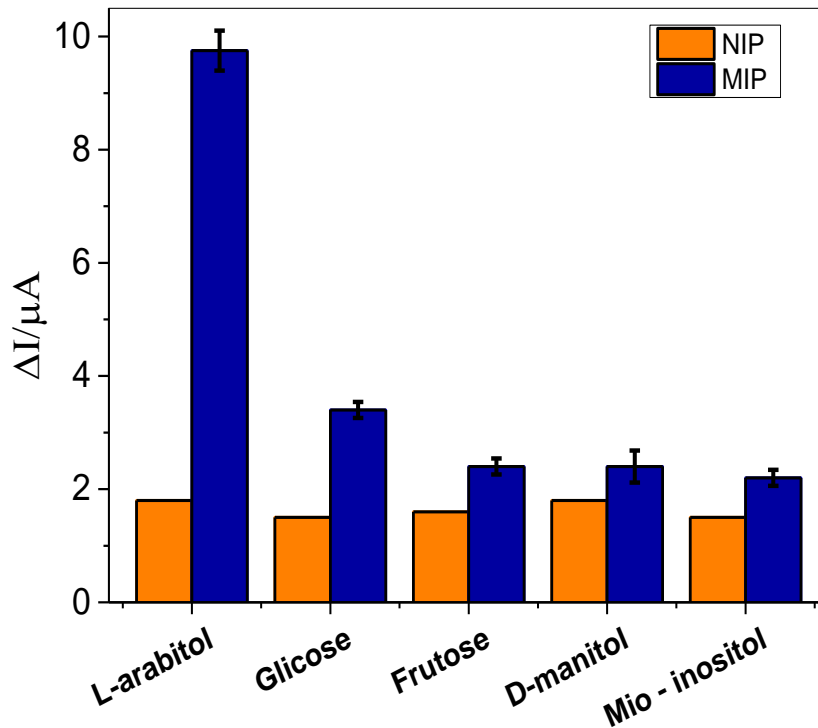


Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4.11 Seletividade, reprodutibilidade e estabilidade do MIP/3DNEE

Para avaliar a seletividade do MIP/3DNEE, foram testados compostos com estrutura química semelhante à molécula de L-arabitol tais como frutose, D-manitol e glicose e mio-inositol. Para isso, cada interferente na concentração de  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> foi adicionado a solução de PBS pH 6,5 e deixado por 30 min sob suave agitação (~50 rpm) em contato com o MIP/3DNEE. Após isso, foi realizada a leitura em DPV e a seletividade foi avaliada como mostrado na Figura 68. Ao analisar esta figura, verificamos que a interferência da glicose foi ligeiramente maior em comparação com as outras substâncias, provavelmente devido ao seu menor tamanho molecular e quantidades de grupos hidroxila em sua estrutura, sendo capaz de maior aproximação dos locais impressos. Para as outras moléculas, a variação na corrente não foi significativa, permanecendo praticamente inalterada. Assim, o sensor desenvolvido mostra ter a capacidade de distinguir a molécula de L-arabitol, em relação à sua estrutura, tamanho e posição dos seus grupos funcionais, das demais moléculas similares encontradas na vinhaça de cana-de-açúcar.

**Figura 68** – Análise da seletividade do MIP/3DNEE para diferentes concentrações de L-arabitol, glicose, D-manitol e frutose.



Fonte: elaborado pelo autor.

Analisando o fator de impressão ( $\alpha$ ) apresentado na Tabela 12, podemos observar que o MIP apresentou maior seletividade ao L-arabitol em comparação ao NIP, sugerindo que cavidades foram formadas na superfície polimérica. O fator de seletividade ( $\beta$ ), mostrou que o sensor foi muito mais seletivo para L-arabitol do que para as demais moléculas, sendo a molécula de D-manitol a que apresentou menor interferência nas análises.

**Tabela 12-** Fator de impressão ( $\alpha$ ) e fator de seletividade ( $\beta$ ) para MIP/3DNEE na presença de moléculas interferentes.

Molécula	MIP ( $\mu A$ )	NIP ( $\mu A$ )	$\alpha$	$\beta$
<b>L-arabitol</b>	10,0	1,8	5,6	1,0
<b>Glicose</b>	3,3	1,5	2,2	2,5
<b>Frutose</b>	2,5	1,6	1,5	3,7
<b>D-manitol</b>	2,2	1,8	1,2	4,6
<b>Mio- inositol</b>	2,3	1,5	1,5	3,7

Fonte: elaborado pelo autor.

Para avaliar a repetibilidade do MIP/3DNEE, o eletrodo foi colocado em solução contendo  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de L-arabitol em PBS pH 6,5 e a corrente foi verificada três vezes consecutivas. Os resultados mostram um desvio padrão relativo de 5,7 %, indicando excelente repetibilidade entre as medidas.

A estabilidade do sensor foi avaliada após um período de armazenamento de 12 dias, à temperatura ambiente e protegido da luz. Após este período, o sensor apresentou 79 % da corrente inicial como mostra a Tabela 13, sugerindo considerável estabilidade de armazenamento.

**Tabela 13-** Estabilidade do MIP/3DNEE

<b>Dia</b>	<b><math>\Delta I / \mu A</math></b>
1°	9,8
6°	8,0
12°	7,7

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4.12 Aplicação do MIP/3DNEE em amostra real

O sensor MIP/3DNEE foi utilizado para investigar a quantidade de L-arabitol presente na vinhaça de cana-de-açúcar. Para isso, as amostras de vinhaça foram preparadas como descrito na seção experimental 3.12.

Após o preparo, 5,0 µL de amostra de vinhaça filtrada foram adicionadas em 10 mL de PBS pH 6,5 e quantidades conhecidas do padrão L-arabitol foram adicionados na amostra na faixa de concentração de  $2,5 \times 10^{-9}$  a  $7,5 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> e a curva de adição de padrão foi construída. As medidas voltamétricas foram realizadas usando DPV e os dados são mostrados na Tabela 11. Com a extrapolação da reta até o eixo das abscissas e levando em consideração as diluições, a concentração de  $17,0 \pm 0,7$  mg de L-arabitol foi encontrada por litro de vinhaça.

Para a validação do método por recuperação, a amostra de vinhaça de cana-de-açúcar foi enriquecida com o padrão de L-arabitol na mesma faixa de concentração da adição de padrão. As recuperações ficaram entre 96,7 % e 104 %, indicando que o método possui um alto grau de exatidão e que o MIP/3DNEE pode ser usado como sensor para a determinação de L-arabitol mesmo em amostras complexas.

**Tabela 14** - Determinação de L-arabitol em vinhaça de cana-de-açúcar (n=3).

<b>Amostra</b>	<b>Adicionado (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Detectado ( mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperado (%)</b>	<b>RSD (%) n=3</b>
	-	$1,1 \times 10^{-9}$		
Vinhaça	$2,5 \times 10^{-9}$	$3,7 \times 10^{-9}$	103	2,5
	$5,0 \times 10^{-9}$	$5,9 \times 10^{-9}$	96.7	3,7
	$7,5 \times 10^{-9}$	$8,9 \times 10^{-9}$	104	5,0

Fonte: elaborado pelo autor.

## 5 CONCLUSÕES

Ao longo desse trabalho a construção de sensores seletivos e sensíveis para D-manitol, mio-inositol e L-arabitol baseados em eletrodos modificados com nanomateriais e polímeros molecularmente impressos foi feita com sucesso para determinação dos analitos em vinhaça de cana-de-açúcar. A elevada área superficial, alta condutividade térmica e elétrica e resistência mecânica proporcionadas pelo óxido de grafeno reduzido combinado com as vantagens das nanopartículas de óxido de ouro e óxido/hidróxido de níquel e também do conjunto de nanoeletrodos de ouro arranjados tridimensionalmente, desempenharam um papel fundamental no desempenho do sensor, proporcionando maior número de locais para imobilização dos polímeros impressos, levando a uma melhoria proeminente na seletividade e sensibilidade.

O MIP/AuNP/RGO-GCE apresentou limite de detecção de  $7,7 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$  sendo o menor limite relatado na literatura quando comparado com outros métodos eletroanalíticos. A sensibilidade amperométrica foi de  $3,9 \times 10^{10} \mu\text{A L mol}^{-1}$ , repetibilidade considerável e estabilidade por até 20 dias quando armazenado. O método proposto apresentou excelente grau de exatidão com recuperações entre 97,5 % e 106,0 %. Além disso, o sensor mostrou seletividade para D-manitol, com variação da corrente cerca de seis vezes maior em comparação com os possíveis interferentes.

A determinação de mio-inositol em MIP/NiNP/RGO-GCE apresentou limites de detecção de  $7,6 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ , ampla faixa linear de resposta, repetibilidade e estabilidade por até 30 dias após o armazenamento, podendo ser reutilizado aproximadamente por 20 vezes. O valor de recuperação ficou entre 96 – 103 %, mostrando que o método apresenta excelente grau de exatidão. O MIP/NiNP/RGO-GCE foi aplicado com sucesso para a determinação de mio-inositol em amostra complexa, como a vinhaça de cana-de-açúcar, com reconhecimento seletivo para esta molécula.

O sensor baseado no conjunto de nanoeletrodos de ouro arranjados tridimensionalmente, 3DNEE, para a formação do MIP/3DNEE foi aplicado com sucesso na determinação de L-arabitol, seletividade para a molécula alvo, excelente reprodutibilidade, estabilidade e exatidão. O sensor também apresentou um amplo intervalo de resposta ( $1,0 \times 10^{-9}$  -  $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ), com LD de  $7,7 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ . Além disso, o sensor demonstrou ser promissor para análise de L-arabitol, mesmo em matrizes complexas.

Assim, para todos os métodos desenvolvidos para a determinação dos polióis em vinhaça de cana-de-açúcar não foi necessário o uso de derivatizações ou preparação laboriosa da amostra, sendo a quantidade encontrada de D-mannitol, mio-inositol e L-arabitol de  $0,19 \pm$

0,50 mg,  $91 \pm 5,1$  mg e  $17,0 \pm 0,7$  mg, respectivamente. Esses compostos poderiam ser utilizados pela indústria farmacêutica e/ou alimentícia, a partir do conceito de biorrefinarias, proporcionando à indústria sucroalcooleira vantagens econômicas, estratégicas e ecológicas, devido a possibilidade do pleno aproveitamento do resíduo.

## REFERÊNCIA

- 1 LOPES, C. H.; GABRIEL, A. V. M. D.; BORGES, M. T. M. R. **Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar**: tecnologia de produção de etanol. São Carlos. Coleção UAB – UFSCar, 2011. 133p.
- 2 DA SILVA, A. P. M.; BONO, J. A. M.; PEREIRA, F. A. R. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. **Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.**, v. 18, p. 38-43, 2014.
- 3 MORAES, B. S. et al. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Appl. Energy**, v. 113, p. 825-835, 2013.
- 4 DA SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.**, v. 11, n. 1, p.108–114, 2007.
- 5 GOVERNO DO BRASIL. **Etanol atingiu produção recorde de 30 bilhões de litros em 2015**. Brasil, 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/05/etanol-atingiu-producao-recorde-de-30-bilhoes-de-litros-em-2015>>. Acesso em 10 jan. 2018.
6. JANKE, L. et al. Biogas Production from Sugarcane Waste: Assessment on Kinetic Challenges for Process Designing. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, n. 9 p. 20685-20703, 2015.
- 7 SAWATDEENARUNAT, C. et al. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. **Bioresour. Technol.**, v. 178, p. 178–186, 2015.
- 8 ESPAÑA-GAMBOA, E. et al. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Manag. Res.**, v. 29, n. 12, p. 1235-1250, 2011.
- 9 CASTRO, G. A. et al. Solvent extraction of organic acids from stillage for its re-use in ethanol production process. **Waste Manag. Res.**, v. 28, n.6, p. 533-538, 2010.
- 10 PARNAUDEAU, V. et al. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 6, p.1553-1562, 2008.
- 11 SEDENHO, G. C. et al. Determination of Electroactive Organic Acids in Sugarcane Vinasse by High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection Using a Nickel Nanoparticle Modified Boron-Doped Diamond. **Energy and Fuels**, v. 31, n. 3, p. 2865-2870, 2017.

- 12 DOWD, M. K. et al. Molecular weight organic composition of ethanol stillage from sugarcane molasses, citrus waste, and sweet whey. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, n. 2 p. 283-288, 1994.
- 13 CATALDI, T. R. I.; MARGIOTTA, G.; ZAMBONIN, C. G. Determination of sugars and alditols in food samples by HPAEC with integrated pulsed amperometric detection using alkaline eluents containing barium or strontium ions. **Food Chem.**, v. 62, n. 1, p. 109-115, 1998.
- 14 ZUMBÊ, A.; LEE, A.; STOREY, D. Polyols in confectionery: the route to sugar-free, reduced sugar and reduced calorie confectionery. **Br. J. Nutr.**, v. 85, n. S1, p. S31-S45, 2001.
- 15 DE OLIVEIRA, P. S. M.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. V. N. Utilização do D-manitol em síntese orgânica. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 441-452, 2009.
- 16 CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- 17 MUIZELAAR, J. P. et al. Mannitol causes compensatory cerebral vasoconstriction and vasodilation in response to blood viscosity changes. **J. Neurosurg.**, v. 59, n. 5, p. 822-828, 1983.
- 18 KO, J. S.; KEUM, J. E.; KO, S. Y. A Synthesis of Oseltamivir (Tamiflu) Starting from D-Mannitol. **J. Org. Chem.**, v. 75, n. 20 p. 7006-7009, 2010.
- 19 NJAU, S. et al. Variations in myo-inositol in fronto-limbic regions and clinical response to electroconvulsive therapy in major depression. **J. Psychiatr. Res.**, v. 80, p. 45-51, 2016.
- 20 STRAWN, J. R. et al. A Pilot Study of Anterior Cingulate Cortex Neurochemistry in Adolescents with Generalized Anxiety Disorder. **Neuropsychobiology**, v. 67, n. 4, p. 224-229, 2013.
- 21 HECHT, S. S. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. **Lancet Oncol.**, v. 3, n. 8, p. 461-469, 2002.
- 22 LAM, S. et al. A Phase I Study of myo-Inositol for Lung Cancer Chemoprevention. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 15, p. 1526-1531, 2006.
- 23 PANDE, M. et al. The effects of combined therapy of myo-inositol and D-chiro inositol in reduction of the individual components of metabolic syndrome in overweight PCOS patients compared to myo-inositol supplementation alone: a prospective randomised controlled trial. **Int J Reprod. Contracept. Obstet. Gynecol.**, v. 6, n. 7, p. 2939-2943, 2017.

- 24 D'ANNA, R. et al. Effects of a new flavonoid and Myo-inositol supplement on some biomarkers of cardiovascular risk in postmenopausal women: a randomized trial. **Int. J. Endocrinol.**, p. 1-7, 2014.
- 25 MARJAŃSKA, M. et al. Treatment effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: A magnetic resonance spectroscopy study after passive immunization. **Neuroscience**, v. 259, p. 94-100, 2014.
- 26 NIWA, H. et al. Ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. **Tetrahedron Lett.**, v. 24, p. 4117-4120, 1983.
- 27 JIANG, M. et al. Microbiological purification of L-arabitol from xylitol mother liquor. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21, n. 1, p. 43-49. 2011.
- 28 KORDOWSKA-WIATER, M. Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects. **J. Appl. Microbiol.**, v. 119, n. 2, p. 303-314, 2015.
- 29 GUINET, Y. et al. Analysis of stochastic crystallization in micron-sized droplets of undercooled liquid L-arabitol. **Carbohydr. Res.**, v. 435, p. 76-82, 2016.
- 30 LEE, J.; CHUNG, B. C. Simultaneous measurement of urinary polyols using gas chromatography/mass spectrometry. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.**, v. 831, p.126-131, 2006.
- 31 DUONG, Q. H. et al. Determination of myo-inositol phosphates in tree nuts and grain fractions by HPLC-ESI-MS. **J. Food Compos. Anal.**, v. 59, p. 74-82, 2017.
- 32 KINDT, E. et al. Quantification of Endogenous myo -Inositol Concentrations in Rat Brain Tissue Homogenates. **Anal. Chem.**, v. 76, n.16, p. 4901-4908, 2004.
- 33 CATALDI, T. R. I.; CAMPA, C.; DE BENEDETTO, G. E. Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. **Fresenius. J. Anal. Chem.**, v. 368, n. 8, p. 739-758, 2000.
- 34 CATALDI, T. R. I. et al. Anion-exchange chromatography with electrochemical detection of alditols and sugars at a Cu<sub>2</sub>O-carbon composite electrode. **J. Chromatogr. A**, v. 773, n. 1/2, p. 115-121, 1997.
- 35 STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 3, p. 159-173, 2003.
- 36 LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, 2006.

- 37 MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Anal. Chem.**, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.
- 38 BALDWIN, R. P.; THOMSEN, K. N. Chemically modified electrodes in liquid chromatography detection: A review. **Talanta**, v. 38, n. 1, p. 1-16, 1991.
- 39 SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Quim. Nova**, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997.
- 40 VAN DER LINDEN, W. E.; DIEKER, J. W. Glassy carbon as electrode material in electro- analytical chemistry. **Anal. Chim. Acta**, v. 119, n. 1, p. 1-24, 1980.
- 41 LIM, W. Q.; GAO, Z. Metal oxide nanoparticles in electroanalysis. **Electroanalysis**, v. 27, n. 9, p. 2074-2090, 2015.
- 42 MENON, V. V. P.; MARTIN, C. R. C. Fabrication and evaluation of nanoelectrode ensembles. **Anal. Chem.**, v. 67, n. 13, p. 1920-1928, 1995.
- 43 RATINAC, K. R. et al. Graphene and Related Materials in Electrochemical Sensing, Graphene and Related Materials in Electrochemical Sensing. **Electroanalysis**, v. 23, n. 4, p. 803-826, 2011.
- 44 LOTA, G. et al. Carbon nanotubes and their composites in electrochemical applications. **Energy Environ. Sci.**, v. 4, p. 1592-1605, 2011.
- 45 SAADAOUI, M. et al. Amperometric xanthine biosensors using glassy carbon electrodes modified with electrografted porous silica nanomaterials loaded with xanthine oxidase. **Microchim. Acta**, v. 183, n. 6, p. 2023-2030, 2016.
- 46 FOGUEL, M. V. et al. Molecularly Imprinted Polymer (MIP): A Promising Recognition System for Development of Optical Sensor for Textile Dyes. **Proc. Technol.**, v. 27, p. 299-300, 2017.
- 47 CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: An updated review. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 96, n. 1, p. 241-259, 2010.
- 48 STRADIOTTO, N. R. et al. The fabrication and characterization of a nickel nanoparticle modified boron doped diamond electrode for electrocatalysis of primary alcohol oxidation. **Electroanalysis**, v. 21, n. 24, p. 2627-2633, 2009.
- 49 KARADENIZ, H. et al. Electrochemical sensing of silver tags labelled DNA immobilized onto disposable graphite electrodes. **Electrochem. commun.**, v. 9, n. 9, p. 2167-2173, 2011.
- 50 DOMÍNGUEZ-RENEDO, O. et al. Electrochemical determination of chromium(VI) using metallic nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 854-858, 2008.

- 51 WU, S. et al. Electrodeposition of silver-DNA hybrid nanoparticles for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose. **Electrochem. commun.**, v. 8, n. 8, p. 1197-1203, 2006.
- 52 LIU, P. et al. Electrochemical sensor for the determination of brucine in human serum based on molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine/SWNTs composite film. **Sens. Actuators, B.**, v. 163, n. 1, p. 84–89, 2012.
- 53 PINGARRÓN, J. M., YAÑEZ-SEDEÑO, P., GONZALEZ-CORTES, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochim. Acta**, v. 53, n. 9, p. 5848-5866, 2008.
- 54 BORKOWSKA, Z.; TYMOSIAK-ZIELINSKA, A.; NOWAKOWSKI, R. High catalytic activity of chemically activated gold electrodes towards electro-oxidation of methanol. **Electrochim. Acta**, v. 49, p. 2613-2621, 2004,
- 55 LACOURSE, W. R. et al. Cathodic re-activation of the gold electrode in pulsed electrochemical detection of carbohydrates. **J. Electroanal. Chem.**, v. 663, p. 30-35, 2011.
- 56 LAREW, L. A.; JOHNSON, D. C. Concentration dependence of the mechanism of glucose oxidation at gold electrodes in alkaline media. **J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.**, v. 262, n. 1/2, p. 167-182, 1989.
- 57 RAFIEE, B.; FAKHARI, A. R. Electrocatalytic oxidation and determination of insulin at nickel oxide nanoparticles-multiwalled carbon nanotube modified screen printed electrode. **Biosens. Bioelectron.** v. 46, p. 130-135, 2013.
- 58 DE LEO, M.; KUHN, A.; UGO, P. 3D-Ensembles of Gold Nanowires: Preparation, Characterization and Electroanalytical Peculiarities. **Electroanalysis**, n. 19, n. 2/3, p. 227-236, 2007.
- 59 VISWANATHAN, S.; RANI, C.; RIBEIRO, S.; DELERUE-MATOS, C. Molecular imprinted nanoelectrodes for ultra sensitive detection of ovarian cancer marker. **Biosens. Bioelectron.**, v. 33, n. 1, p. 179-183, 2012.
- 60 UGO, P.; MORETTO, L. M.; SILVESTRINI, M.; PEREIRA, F. C. Nanoelectrode ensembles for the direct voltammetric determination of trace iodide in water. **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 90, p. 747–759, 2010.
- 61 UGO, P.; MORETTO, L. M. Template deposition of metal. In: ZOSKI, C.G. (Ed.). **Handbook of Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007. chap. 16.2, p. 678-709.
- 62 STORTINI, A. M. et al. Arrays of copper nanowire electrodes: Preparation, characterization and application as nitrate sensor. **Sens. Actuators, B**, v. 207, p. 186–192, 2005.

- 63 MARDEGAN, A. et al. Ensembles of Gold Nanowires for the Anodic Stripping Voltammetric Determination of Inorganic Arsenic. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v.15, p. 3417-3422, 2015.
- 64 LI, H. H. et al. A novel electrochemical sensor for epinephrine based on three dimensional molecularly imprinted polymer arrays. **Sens. Actuators, B**, v. 222, p. 1127-1133, 2016.
- 65 LEE, K-B.; PARK, S.; MIRKIN, C. A. Multicomponent Magnetic Nanorods for Biomolecular Separations. **Angew. Chemie Int. Ed**, v. 43, n. 23, p. 3048-3050. 2004.
- 66 HUANG, W. R. et al. Fabrication of gold/polypyrrole core/shell nanowires on flexible substrate for molecular imprinted electrochemical sensor. **RSC Adv.**, v. 4, p. 62393-62398, 2014.
- 67 IUPAC Compendium of Chemical Terminology: **The gold book** Research Triangle Park, NC, 2005. Disponível em: < <http://goldbook.iupac.org/>>. Acesso em: 20 ago. 2017.
- 68 SHAO, Y. et al. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: A review. **Electroanalysis**, v. 22, n. 10, p. 1027-1036, 2010.
- 69 RATINAC, K. R. et al. Graphene and related materials in electrochemical sensing. **Electroanalysis**, v. 23, n. 4, p. 803-826. 2011
- 70 CHEN, D.; FENG, H.; LI, J. Graphene oxide: Preparation, functionalization, and electrochemical applications. **Chem. Rev.**, v. 112, n. 11, p. 6027-6053, 2012.
- 71 CHUA, C. K.; PUMERA, M. Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 1, p. 291-312, 2014.
- 72 AGHAEI, A.; HOSSEINI, M. R. M.; NAJAFI, M. A novel capacitive biosensor for cholesterol assay that uses an electropolymerized molecularly imprinted polymer. **Electrochim. Acta**, v. 55, n. 5, p. 1503-1508, 2010.
- 73 JIANG, Z.; LI, G.; ZHANG, M. A novel sensor based on bifunctional monomer molecularly imprinted film at graphene modified glassy carbon electrode for detecting traces of moxifloxacin. **RSC Adv.**, v. 6, n. 39, p. 32915-32921, 2016.
- 74 SURYANARAYANAN, V.; WU, C-T.; HO, K-C. Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors. **Electroanalysis**, v. 22, n. 16, p. 1795-1811, 2010.
- 75 SHARMA, P. S. et al. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, n. 10, p. 3177-3204, 2012.
- 76 ÖZCAN, L.; ŞAHİN, Y. Determination of paracetamol based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode. **Sens. Actuators, B**, v. 127, p. 362-369, 2007.

- 77 WANG, Q. et al. An Electrochemical Sensor for Reducing Sugars Based on a Glassy Carbon Electrode Modified with Electropolymerized Molecularly Imprinted Poly-o-phenylenediamine Film. **Electroanalysis**, v. 26, n. 7, p. 1612-1622, 2014.
- 78 BELUOMINI, M. A. et al. D-mannitol sensor based on molecularly imprinted polymer on electrode modified with reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles. **Talanta**, v. 165, p. 231-239, 2017.
- 79 SYRITSKI, V. et al. Electrosynthesized molecularly imprinted polypyrrole films for enantioselective recognition of l-aspartic acid. **Electrochim. Acta**, v. 53, p. 2729-2736, 2008.
- 80 WANG, F.; ZHU, L.; ZHANG, J. Electrochemical sensor for levofloxacin based on molecularly imprinted polypyrrole-graphene-gold nanoparticles modified electrode. **Sens. Actuators, B**, v. 192, p. 642-647. 2014.
- 81 MALITESTA, C. et al. MIP sensors - The electrochemical approach. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, p. 1827-1846, 2012.
- 82 CHEN, L. et al. Molecular imprinting: perspectives and applications. **Chem. Soc. Rev.**, v. 45, p. 2137-2211, 2016.
- 83 WHITCOMBE, M. J. et al. The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, n. 3, p. 1547-1571, 2011.
- 84 DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; RAMOS STRADIOTTO, N. R. Cathodic electrochemical determination of furfural in sugarcane bagasse using an electrode modified with nickel nanoparticles. **Anal. Methods**, v. 9, n. 5, p. 826-834, 2017.
- 85 ONGARO, M. et al. Electrochemical synthesis and characterization of hierarchically branched ZnO nanostructures on ensembles of gold nanowires. **Electrochim. Acta**, v. 78, p. 539-546, 2012.
86. HILDER, M. et al. Direct electro-deposition of graphene from aqueous suspensions. **Phys. Chem.**, v. 13, p. 9187-9193, 2011.
- 87 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. Electrochemical methods: fundamentals and applications. New York: Wiley, 2001.
- 88 PRABHU, S. V.; BALDWIN, R. P. Electrocatalysis and detection of amino sugars, alditols, and acidic sugars at a copper-containing chemically modified electrode. **Anal. Chem.**, v. 61, p. 2258-2263, 1989.
- 89 VITT, J. E.; LAREW, L. A.; JOHNSON, D. C. The importance of adsorption in anodic surface-catalyzed oxygen-transfer reactions at gold electrodes. **Electroanalysis**, v. 2, p. 21-30. 1990.

- 90 ŠTRBAC, S.; ADŽIĆ, R. R. The influence of OH<sup>-</sup> chemisorption on the catalytic properties of gold single crystal surfaces for oxygen reduction in alkaline solutions. **J. Electroanal. Chem.**, v. 403, p. 169–181, 1996.
- 91 LOSITO, I.; PALMISANO, F.; ZAMBONIN, P. G. o-Phenylenediamine electropolymerization by cyclic voltammetry combined with electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 75, p. 4988–4995, 2003.
- 92 KOR, K.; ZAREI, K. Development and characterization of an electrochemical sensor for furosemide detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer. **Talanta**, v. 146, p.181–187, 2016.
- 93 NASCENTE, P. A. P. Materials characterization by X-ray photoelectron spectroscopy. **J. Mol. Catal. A Chem.**, v. 228, p. 145–150, 2005.
- 94 HANKO, V. P.; ROHRER, J. S. Determination of carbohydrates, sugar alcohols, and glycols in cell cultures and fermentation broths using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Anal. Biochem.**, v. 283, p. 192–199, 2000.
- 95 CHEN, Q.; ZHANG, L.; CHEN, G. Facile preparation of graphene-copper nanoparticle composite by in situ chemical reduction for electrochemical sensing of carbohydrates. **Anal. Chem.**, v. 84, p. 171–178, 2012.
- 96 FU, Y.; ZHANG, L.; CHEN, G. Preparation of a carbon nanotube-copper nanoparticle hybrid by chemical reduction for use in the electrochemical sensing of carbohydrates. **Carbon**, v. 50, p. 2563–2570, 2012.
- 97 CASELLA, I. G. et al. Electrocatalytic oxidation and liquid chromatographic detection of aliphatic alcohols at a nickel-based glassy carbon modified electrode. **Anal. Chem.**, v. 65, p. 3143-3150, 1993.
- 98 TANG, K.; LIANG, L.; CAI, Y.; MOU, S. Determination of sugars and alditols in tobacco with high performance anion-exchange chromatography. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 2160-2166, 2007.
- 99 DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; SEDENHO, G. C.; STRADIOTTO, N. R. Determination of amino acids in sugarcane vinasse by ion chromatographic using nickel nanoparticles on reduced graphene oxide modified electrode. **Microchem. J.**, v. 134 p. 374-382, 2017.
- 100 DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Determination of furanic aldehydes in sugarcane bagasse by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection using a modified electrode with nickel nanoparticles. **J. Sep. Sci.**, v. 38, n. 18, p. 3176-3182, 2015.

101 BELUOMINI, M. A.; LUIZ DA SILVA, J.; STRADIOTTO, N. R. Determination of uronic acids in sugarcane bagasse by anion-exchange chromatography using an electrode modified with copper nanoparticles. **Anal. Methods**, v. 7, p. 2347-2353, 2015.

102 SANTOS, F. C. U. et al. Electrochemical determination of total reducing sugars from bioethanol production using glassy carbon electrode modified with graphene oxide containing copper nanoparticles. **Fuel**, v. 163, p. 112-121, 2016.

103 BELUOMINI, M. A.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Amperometric determination of myo-inositol by using a glassy carbon electrode modified with molecularly imprinted polypyrrole, reduced graphene oxide and nickel nanoparticles. **Microchim. Acta**, 2018. doi:10.1007/s00604-018-2710-0.

104 SCHWEIGER, B. et al. Electropolymerized molecularly imprinted polypyrrole film for sensing of clofibrac acid. **Sensors**, v. 15, p. 4870-4889. 2015.

105 HSUEH, C.; BRAJTER-TOTH, A. Electrochemical preparation and analytical applications of ultrathin overoxidized polypyrrole films. **Anal. Chem.**, v. 66, p. 2458-2464, 1994.

106 ÖZKORUCUKLU, S. P.; ŞAHIN, Y.; ALSANCAK, G. Voltammetric behaviour of sulfamethoxazole on electropolymerized- molecularly imprinted overoxidized polypyrrole. **Sensors**, v. 8, p. 8463-8478, 2008.

107 LI, Y.; QIAN, R. Electrochemical overoxidation of conducting polypyrrole nitrate film in aqueous solutions. **Electrochim. Acta**, v. 45, p. 1727-1731, 2000.

108 GRASES, F. et al. Determination of myo-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 510, p. 41-43, 2004.

109 INDYK, H. E.; WOOLLARD, D. C. Determination of free myo-inositol in milk and infant formula by high-performance liquid chromatography. **Analyst**, v.119, n. 3, p. 397-402, 1994.

110 PORTAL BRASIL. **Safra 2017/2018 de cana-de-açúcar deve ser de 647 milhões de toneladas**. Brasil 2017, Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/04/safra-2017-2018-de-cana-de-acucar-deve-ser-de-647-milhoes-de-toneladas>> Acesso em 1 Ago. 2017.

111 SILVESTRINI, M. et al. Modification of nanoelectrode ensembles by thiols and disulfides to prevent non specific adsorption of proteins. **Electrochim. Acta**, v. 56, p. 7718-7724, 2011

112 ONGARO, M.; UGO, P. Bioelectroanalysis with nanoelectrode ensembles and arrays. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 405, p. 3715-3729, 2013.

113 LI, X. et al. Fabrication and modeling of an ultrasensitive label free impedimetric immunosensor for aflatoxin B1 based on protein A self-assembly modified gold 3D nanotube electrode ensembles. **Electrochim. Acta**, v. 247, p. 1052–1059, 2017.

114 PAPAIOANNOU, E.; KOUTSAS, C.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Molecularly imprinted polymers for RGD selective recognition and separation. **Amino Acids**, v. 36, p. 563-569, 2009.

115 DILTEMIZ, S.E. et al. Biosensors and bioelectronics designing of MIP based QCM sensor having thymine recognition sites based on biomimicking DNA approach. **Biosens. Bioelectron.**, v. 25, p. 599-603, 2009.

## APÊNDICE A - Simulação computacional

A Tabela 1 abaixo mostra a energia liberada para formação da ligação entre as moléculas do monômero e a molécula molde, simulada computacionalmente. Para comparação entre essas energias, tomamos como referência a força de ligação entre C=C (considerável forte) que é de aproximadamente  $615 \text{ kJ mol}^{-1}$  (1). Assim, a energia de ligação entre o monômero e a molécula molde não pode ser extremamente forte, pois pode comprometer a retirada da molécula molde da matriz polimérica para formação das cavidades de reconhecimento. Por outro lado, a interação não pode ser muito fraca, pois pode dificultar a formação da rede polimérica contendo a molécula molde. Os valores encontrados sugerem que as interações entre os nitrogênios dos monômeros considerados com os grupos –OH das moléculas moldes são relativamente fortes para promover a interação entre eles e assim contribuir para que o processo de impressão na superfície do eletrodo aconteça. Com base na média da energia de ligação, podemos observar que tanto o monômero o-fenilenodiamina quanto o pirrol, são capazes de interagir satisfatoriamente com as moléculas de polióis.

**Tabela 1** - Média da energia de ligação em  $\text{kJ mol}^{-1}$  entre as moléculas de polióis e os monômeros o-fenilenodiamina (MP1) e pirrol (MP2).

Molécula	Monômeros	
	MP1*	MP2*
<b>D-manitol</b>	$-75,250 \pm 9,510$	$-77,005 \pm 7,130$
<b>L(-)arabitol</b>	$-131,835 \pm 7,931$	$-71,156 \pm 4,575$
<b>Mio-inositol</b>	$-92,210 \pm 0,439$	$-97,775 \pm 4,233$

\*MP1 – monômero o-fenilenodiamina / MP2 – monômero pirrol

## REFERÊNCIA

1 BARROW, G. M. Termoquímica. In:\_\_\_\_\_. **Físico-química**. 4 ed. Rio de Janeiro: Reverté 1983. Cap. 5, p.210.