

Thulio César Pereira

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

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

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

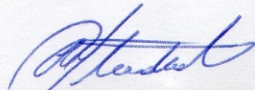
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

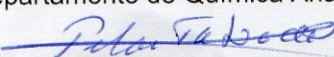
TÍTULO DA TESE: "Sensores eletroquímicos baseados em polímeros molecularmente impressos sobre superfícies contendo grafeno e nanopartículas metálicas para a determinação de ácidos orgânicos na vinhaça de cana de açúcar"

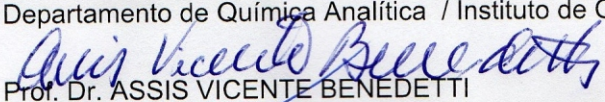
AUTOR: THULIO CÉSAR PEREIRA

ORIENTADOR: NELSON RAMOS STRADIOTTO

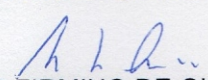
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


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


Prof.^a Dr.^a MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. ASSIS VICENTE BENEDETTI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. BRUNO CAMPOS JANEGITZ
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAr - Araras


Prof. Dr. MARCELO FIRMINO DE OLIVEIRA
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 21 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES

1-DADOS PESSOAIS

Nome: Thulio César Pereira

Nacionalidade: Brasileiro

Nascimento: 27/08/1990

Naturalidade: Caxias/MA

Endereço profissional: Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Química de Araraquara – Departamento de Química Analítica
Rua Prof. Francisco Degni, nº 55, Bairro Quitandinha,
Araraquara, 14800-900, SP-Brasil

Telefone: (16) 3301-9581

Endereço eletrônico: tuliocs22@gmail.com

2-FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2015-2019

Doutorado em Química

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

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

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

2012-2014

Mestrado em Química

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Aldaléa Lopes Brandes Marques

2008-2012

Graduação em Licenciatura em Química

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

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

Orientador: Prof. MSc. Péricles Mendes Nunes

3-PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo completo submetido em periódicos

Pereira, Thulio César e Stradiotto, Nelson Ramos.

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

Artigos completos publicados em periódicos

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

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

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

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

Resumos publicados em anais de congressos científicos

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e saúde.

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

À minha irmã Fernada Mendes Pereira pelo amor, confiança.

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

Aos meus tios Francisco e Joana pela educação.

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

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

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

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

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

A CAPES pela bolsa concedida.

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

“Levanta e anda.”
(*Emicida*)

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

Figura 38- Imagens MEV-FEG para: (a) GCE-RGO, (b) GCE-RGO-CuNPs, (c) GCE-RGO-CuNPs-MIP, (d) GCE-RGO-CuNPs-NIP e (e) Espectro EDX para GCE-RGO-CuNPs.....86

Figura 39- Resposta em ΔI para o efeito do número de ciclos voltamétricos na eletropolimerização de IAA numa concentração de $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ácido málico $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 88

Figura 40- Resposta para o efeito da variação de pH da solução utilizada como meio para a eletropolimerização do monômero IAA numa concentração $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido málico, utilizando tampão PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ 90

Figura 41- Resposta em variação de corrente para o efeito da razão molar entre o monômero IAA e ácido málico (molécula molde) no processo de eletropolimerização, para uma concentração de $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de IAA em tampão PBS com pH 6,0.....91

Figura 42- Influência do número de ciclos voltamétricos aplicados na etapa de extração da molécula molde na resposta em variação de corrente para o sensor impresso GCE-RGO-CuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-CuNPs-NIP.....93

Figura 43- Influência do tempo de religação do ácido málico, numa concentração de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, na resposta em variação de corrente para o sensor impresso GCE-RGO-CuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-CuNPs-NIP.....94

Figura 44- Imagens AFM para: (a) GCE-RGO-CuNPs-MIP, (b) GCE-RGO-CuNPs-MIP remoção, (c) GCE-RGO-CuNPs-MIP religação e (d) GCE-RGO-CuNPs-NIP.....95

Figura 45- Curva analítica para o sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP obtida após sucessivas adições de ácido málico, após 15 minutos de contato. Figura interna superior: primeira região linear do sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP para o intervalo de concentrações de ácido málico de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Figura interna inferior: voltamogramas DPV para a oxidação da sonda após adições sucessivas de ácido málico no intervalo de concentrações de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ 97

Figura 46- Isoterma de ligação para o eletrodo GCE-RGO-CuNPs-MIP após a religação de diferentes concentrações de ácido málico: Figura interna: curva linearizada para a adsorção de ácido málico no MIP.....99

Figura 47- Estudo de interferentes para o sensor impresso GCE-RGO-CuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-CuNPs-NIP, resposta em variação de corrente após a religação com uma solução de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de: ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, glicose e glicerol.....101

Figura 48- Curva de adição de padrão para a determinação de ácido málico em amostras de vinhaça de cana de açúcar.....103

LISTA DE TABELAS

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

Sumário

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vinhaça da cana de açúcar

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

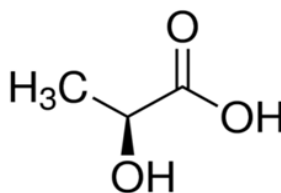
1.2 Ácidos orgânicos

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

1.2.1 Ácido láctico

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

Figura 1- Estrutura da molécula de ácido láctico



Fonte: elaborado pelo autor

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

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

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

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

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

1.2.2 Ácido málico

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

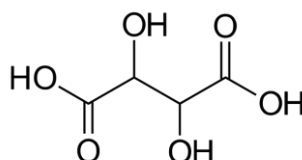
Muitas vezes é ingerido na forma de suplemento, especialmente para o tratamento da chamada síndrome de fadiga crônica, esse ácido é reconhecido por sua capacidade de aumentar a energia corporal e a tolerância ao exercício, isso por que é um componente essencial do chamado ciclo de Krebs, que converte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

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

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

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

Figura 2- Estrutura da molécula de ácido málico



Fonte: elaborado pelo autor

1.3 Métodos para a determinação de ácidos orgânicos

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

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

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

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

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

1.3 Sensores Eletroquímicos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Polímeros Molecularmente Impressos

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

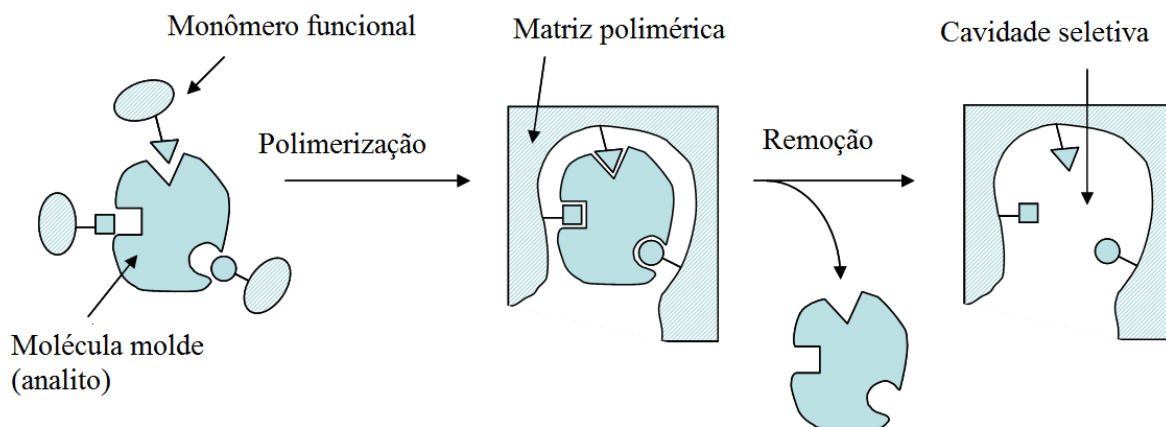
Os MIPs são receptores artificiais biomiméticos, ou seja, materiais sintéticos dotados de sítios específicos de reconhecimento para uma molécula de interesse, os quais mimetizam

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

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

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

Figura 3- Esquema geral para o preparo de MIP



Fonte: Adaptado [41]

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

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

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

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

1.4 Nanopartículas metálicas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 Óxido de grafeno reduzido

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

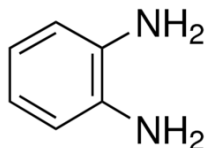
1.6 Monômeros funcionais

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

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

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

Figura 4- Estrutura da molécula do monômero o-PD

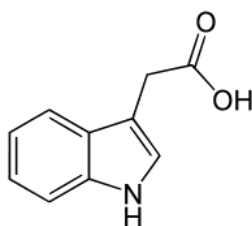


Fonte: elaborado pelo autor

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

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

Figura 5-Estrutura da molécula de ácido indol acético



Fonte: elaborado pelo autor

1.7 Sinal analítico em sensores eletroquímicos baseados em MIP

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

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

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

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Levando em consideração a importância tecnológica dos ácidos orgânicos e a possibilidade de seu reaproveitamento a partir da vinhaça de cana-de-açúcar o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos alternativos para a determinação desses compostos, utilizando sensores eletroquímicos baseados em polímeros molecularmente impressos obtidos em eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido e nanopartículas metálicas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Preparar eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido (RGO)
- ✓ Preparar eletrodos modificados com nanopartículas metálicas de ouro (AuNPs) sobre superfície de RGO
- ✓ Preparar eletrodos modificados com nanopartículas de óxido de cobre (CuNPs) sobre superfície de RGO
- ✓ Preparar MIP sobre superfície modificada com RGO-AuNPs através da eletropolimerização do monômero o-fenilenodiamina (o-PD).
- ✓ Preparar MIP sobre superfície modificada com RGO-CuNPs através da eletropolimerização do monômero ácido indol acético (IAA).
- ✓ Caracterizar os eletrodos modificados utilizando técnicas eletroquímicas, microscópicas e espectroscópicas.

- ✓ Desenvolver o método analítico para o ácido láctico utilizando o eletrodo modificado GCE-RGO-AuNPs-MIP
- ✓ Desenvolver o método analítico para o ácido málico utilizando o eletrodo modificado GCE-RGO-CuNPs-MIP
- ✓ Aplicar o método desenvolvido para a determinação dos ácidos orgânicos estudados em vinhaça de cana-de-açúcar

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas com um Potenciostato/Galvanostato PGSTAT-30 AUTOLAB utilizando uma célula eletroquímica convencional de 25 mL portando três eletrodos controlados pelo software Nova 1.10.

O eletrodo de referência foi prata/cloreto de prata (Ag/AgCl , $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$), como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina ($0,3 \text{ mm} \times 4,0 \text{ cm}$) e como eletrodo de trabalho foi utilizado o eletrodo de carbono vítreo (GCE) com diâmetro de $3,0 \text{ mm}$, com área de aproximadamente $0,07 \text{ cm}^2$, o qual foi modificado com RGO, AuNPs, CuNPs, e MIP para a construção dos sensores propostos, com todas as medidas realizadas em temperatura ambiente.

Para estudar a morfologia da superfície nanoestruturada, 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 256×256 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.

3.2 Reagentes e soluções

Ácido láctico (pureza 99%), o-fenilenodiamina (pureza: $\geq 98 \%$), ácido málico (pureza 99%), ácido indol acético (pureza: $\geq 98 \%$), óxido de grafeno (GO, pureza: $> 95 \%$), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, pureza: 99%),

ácido cloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \sim 52\%$ de ouro), sulfato de cobre (CuSO_4), cloreto de potássio (KCl), di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), hidrogenofosfato de dipotássio (K_2HPO_4), acetonitrila (99.8 %), sulfato de sódio (Na_2SO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, pó de grafite. Para o preparo de todas as soluções foi utilizada água deionizada (MILLI-Q) com resistividade 18,2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$.

3.3 Limpeza do eletrodo GCE

A limpeza do eletrodo GCE foi realizada em duas etapas, inicialmente através de polimento mecânico com tecido de feltro juntamente com uma suspensão de alumina de granulometria 0,30 μm sendo posteriormente lavado abundantemente com água ultrapura.

Na segunda etapa a limpeza foi realizada eletroquimicamente utilizando voltametria cíclica, aplicando sucessivas varreduras na faixa de potencial de -0,50 a 1,50 V (vs. $\text{Ag/AgCl } 3,0\text{ mol L}^{-1}$), numa velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em solução de H_2SO_4 de concentração de 0,50 mol L^{-1} até a obtenção de um voltamograma sem picos de oxidação ou redução, confirmando a remoção de contaminantes que poderiam estar adsorvidos nessa superfície, após este processo o eletrodo foi novamente lavado com água ultrapura.

3.4 Modificação do eletrodo com óxido de grafeno reduzido

3.4.1 Sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP

Seguindo procedimentos desenvolvidos no grupo de pesquisa[43] suspensões de óxido de grafeno (GO) numa concentração de 0,50 mg mL^{-1} foram preparadas em água ultrapura e posteriormente dispersas numa solução de Na_2SO_4 numa concentração de 0,10 mol L^{-1} , para a esfoliação das folhas de grafeno a suspensão preparada foi deixada em banho ultrassom por um tempo de 4 h.

Em seguida o eletrodo de GCE foi imerso nessa suspensão e utilizando a técnica de Cronoamperometria, aplicando o potencial de -1,50 V (vs. $\text{Ag/AgCl } 3,0\text{ mol L}^{-1}$) por um tempo de 600 segundos, realizou-se a eletrodeposição de óxido de grafeno reduzido (RGO) sobre a superfície do eletrodo. Posteriormente realizou-se a secagem do eletrodo em temperatura ambiente.

3.4.2 Sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP

3.4.3 Preparo óxido de grafeno

Para este sensor, óxido de grafeno (GO) foi sintetizado no nosso laboratório, Instituto de Pesquisas em Bioenergia-IPBEN no Instituto de Química de Araraquara, a partir de pó de grafite, de acordo com o método modificado de Hummers, seguindo procedimento descrito na literatura [71].

Primeiro uma alíquota de 5,0 g de pó de grafite foi tratada duas vezes com HCl 5% com posterior filtração à vácuo, em seguida foi lavada mais uma vez com água destilada e seca em estufa numa temperatura de 110 °C durante 24 h.

Dando continuidade, a alíquota de pó de grafite tratada e seca foi colocada em banho de gelo (0°C), sendo adicionado lentamente e sob agitação, H₂SO₄ concentrado (115 mL) e KMnO₄ (15 g), não permitindo que a temperatura do meio reacional excedesse 20 °C, após as adições a mistura foi então agitada por mais 40 minutos.

Finalizada a etapa de agitação foi adicionado lentamente ao meio reacional água destilada (230 mL) para elevar a temperatura do meio a 98 °C, depois de alcançada esta temperatura, com auxílio de um banho térmico a temperatura do meio foi levada a 30 °C, sendo mantida neste valor por 30 minutos, o procedimento foi finalizado com a adição de mais 700 mL de água destilada e 50 mL de H₂O₂ (30%) ao meio reacional.

Finalmente, após todas as reações o meio reacional foi mantido em temperatura ambiente durante 24 h e então a mistura foi filtrada e lavada mais uma vez com HCl 5% para a remoção do excesso de sulfato presente, após esta etapa o produto obtido foi seco em estufa por mais 24 h numa temperatura de 50 °C, sendo posteriormente utilizado para realizar as modificações descritas na superfície do eletrodo GCE.

3.4.4 Eletrodeposição do óxido de grafeno reduzido

Para a eletrodeposição na superfície do eletrodo GCE, suspensões do óxido de grafeno (GO) sintetizado foram preparadas numa concentração de 2,0 mg mL⁻¹ em água ultrapura, posteriormente foram dispersas numa solução de Na₂SO₄ de concentração de 0,10 mol L⁻¹, para realizar a esfoliação das folhas de grafeno a suspensão foi deixada em banho ultrassom por um tempo de 4 h.

Uma alíquota de 1,0 µL dessa suspensão foi levada diretamente para a superfície do eletrodo GCE e após sua secagem em temperatura ambiente foi utilizada a técnica de

voltametria cíclica para promover a redução do GO à RGO aplicando para tal 7 ciclos voltamétricos consecutivos no intervalo de potencial de 0,0 a -1,5 V em meio desaerado de Na_2SO_4 0,10 mol L⁻¹.

3.5 Modificação do eletrodo com nanopartículas de ouro

Para a construção do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP, após a secagem do RGO eletrodepositado na superfície do eletrodo GCE, o eletrodo modificado GCE-RGO foi imerso numa solução de H_2SO_4 de concentração 0,50 mol L⁻¹ contendo $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de HAuCl_4 para a eletrodeposição das nanopartículas de ouro (AuNPs).

Utilizando a técnica de cronoamperometria, foi aplicado um potencial de + 0,40 V durante 100 segundos para a obtenção das AuNPs sobre a superfície GCE-RGO, neste tempo de eletrodeposição foram obtidas as melhores respostas para o eletrodo, após tal procedimento o eletrodo foi lavado com água ultrapura e levado para o preparo do MIP.

3.6 Modificação do eletrodo com nanopartículas de cobre

Para a construção do sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP, após a eletrodeposição de RGO no eletrodo GCE utilizando a técnica de VC, o eletrodo modificado GCE-RGO foi imerso numa solução de Na_2SO_4 0,10 mol L⁻¹ contendo CuSO_4 numa concentração $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, utilizando a técnica de cronoamperometria e aplicando um potencial de -0,4 V até a eletrodeposição de uma carga de 5 mC do metal na superfície do eletrodo, com este valor de carga eletrodepositada foram obtidos os melhores resultados para a resposta do eletrodo.

Para a formação do óxido de cobre na superfície do eletrodo, após a eletrodeposição das nanopartículas metálicas o eletrodo foi imerso numa solução desaerada de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e utilizando a técnica de voltametria cíclica foram aplicados 20 ciclos sucessivos no intervalo de -0,6 a 0,3 V para a obtenção do óxido de cobre na superfície do eletrodo.

3.7 Modificação do eletrodo com polímeros molecularmente impressos

3.7.1 Sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP

Para a obtenção do MIP sobre a superfície do eletrodo modificado GCE-RGO-AuNPs foi utilizada uma solução do monômero o-fenilenodiamina (o-PD) numa concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ na presença de ácido láctico $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, em tampão fosfato (PBS) 0,10 mol L⁻¹ com pH 5,0.

Utilizando a técnica de voltametria cíclica aplicou-se 25 ciclos sucessivos numa velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , num intervalo de potencial de 0,0 a 0,80 V (vs. Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Foi utilizada uma solução de acetonitrila para a remoção da molécula molde, sob agitação branda (aproximadamente 50 “rpm”) por um tempo de 60 segundos de contato do eletrodo com o solvente.

3.7.2 Sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP

Para a obtenção do MIP sobre a superfície do eletrodo modificado GCE-RGO-CuNPs foi utilizada uma solução de ácido indol acético numa concentração de $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ácido málico $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão fosfato (PBS) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 6,0. Utilizando a técnica de voltametria cíclica aplicou-se 10 ciclos sucessivos numa velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , num intervalo de potencial de 0,0 a 1,30 V (vs. Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Para a remoção da molécula molde após a polimerização do monômero foi utilizada uma solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, e com a técnica de voltametria cíclica foram aplicados 3 ciclos sucessivos no intervalo de 0,0 V a 1,6 V numa velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

3.8 Caracterização do eletrodo modificado

Com o objetivo de caracterizar eletroquimicamente cada uma das modificações realizadas na superfície do eletrodo de GCE para a construção dos sensores propostos foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), os experimentos de EIE foram realizados numa faixa de frequência de: $1,0 \times 10^5$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ Hz}$, num potencial de 0,22 V com uma amplitude “rms” de 10 mV para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP e $1,0 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ Hz}$ para o sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP, nos mesmos potenciais e amplitudes.

Também foram realizadas caracterizações morfológicas da superfície do eletrodo de GCE após cada uma das modificações utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), para as etapas de construção do MIP na superfície modificada do eletrodo foi utilizada a técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM).

3.9 Determinação dos ácidos em vinhaça de cana de açúcar

Para a aplicação dos sensores desenvolvidos foram utilizadas amostras de vinhaça de cana de açúcar da usina São Martinho. Inicialmente as amostras foram centrifugadas numa

velocidade 4000 “rpm” durante 20 minutos com o objetivo de separar as partículas sólidas presentes neste resíduo, em seguida o sobrenadante foi filtrado em filtros de porosidade 0,47 μm .

Para a quantificação, a vinhaça filtrada foi diluída em tampão PBS de pH 6,0 com o objetivo de obter uma concentração final para o analito dentro da faixa de concentração estudada durante o desenvolvimento dos métodos.

As determinações do ácido láctico (GCE-RGO-AuNPs-MIP) e ácido málico (GCE-RGO-CuNPs-MIP) foram realizadas através do método de adição de padrão e a validação da metodologia desenvolvida foi realizada por meio de ensaios de recuperação. O valor médio obtido através dos ensaios de recuperação, para cada uma das concentrações adicionadas, foi analisado através do desvio padrão residual (RSD) e do teste t de Student não pareado.

Para a obtenção do sinal analítico na forma de ΔI a partir da oxidação da sonda eletroquímica foi utilizada a técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV), numa faixa de potencial de - 0,20 a + 0,60 V (vs. Ag/AgCl), amplitude de potencial de pulso de 50 mV, tempo de duração do pulso de 50 ms e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} , para esta etapa todos os experimentos foram realizados em meio de KCl 0,10 mol L^{-1} .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

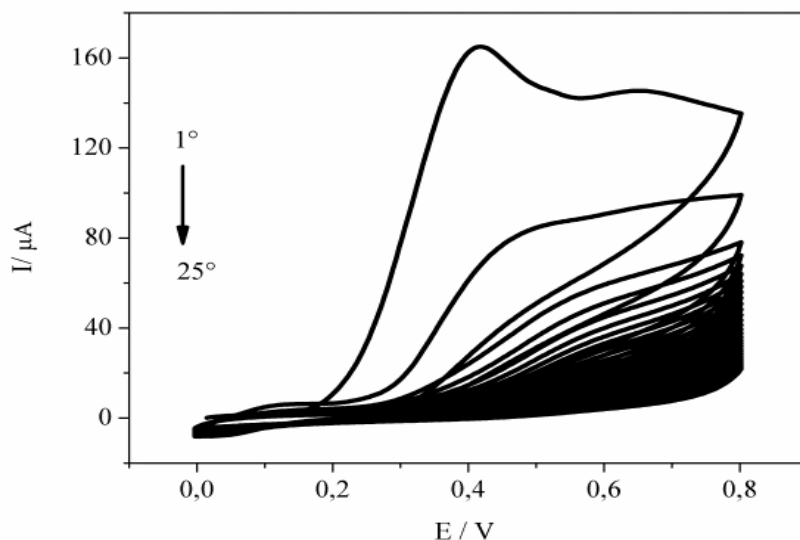
4.1 Preparação do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP

4.1.1 Eletropolimerização do monômero o-PD

A eletropolimerização do monômero o-PD para a obtenção do MIP sobre a superfície modificada do eletrodo (GCE-RGO-AuNPs) foi realizada na presença de moléculas de ácido láctico utilizando a técnica de voltametria cíclica, aplicando 25 sucessivos ciclos num intervalo de potencial de 0,0 a 0,8 V vs. Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$), empregando uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

A Figura 6 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos durante esse processo, utilizando uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do monômero o-PD juntamente com uma solução de ácido láctico $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (proporção molar de 1:5), em tampão PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0.

Figura 6- Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização do monômero o-PD $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ no eletrodo modificado GCE-RGO-AuNPs na presença de ácido láctico $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, numa velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .



Fonte: elaborado pelo autor

Ao analisar a Figura 6 é possível observar a presença de um pico anódico irreversível em $0,43 \text{ V vs. Ag/AgCl } (3,0 \text{ mol L}^{-1})$, o qual corresponde à oxidação do monômero o-PD na superfície do eletrodo modificado GCE-RGO-AuNPs, formando um cátion radical univalente,

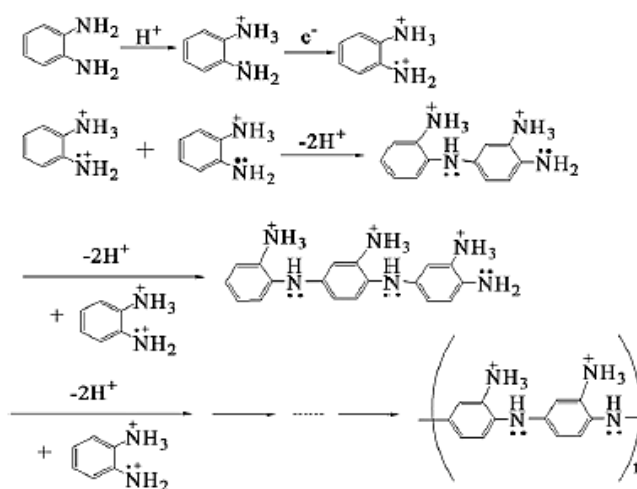
responsável por desencadear e manter a reação de polimerização para a formação da matriz polimérica [72,73].

Ainda analisando a Figura 6 observa-se que as intensidades de corrente de pico diminuem progressivamente com o aumento do número de ciclos voltamétricos, tal comportamento é característico para a polimerização utilizando esse monômero [74] e indica a formação de um filme pouco condutor na superfície do eletrodo GCE-RGO-AuNPs.

O mecanismo descrito na literatura para a reação de polimerização do monômero o-PD na superfície de eletrodos está resumidamente descrito na Figura 7.

A primeira etapa do processo de polimerização consiste na oxidação 0,43 V (Figura 6) do monômero o-PD na superfície GCE-RGO-AuNPs para a formação de um cátion radical univalente, o qual numa etapa posterior reage com outra molécula de um monômero neutro para a formação de um dímero[73].

Figura 7- Esquema geral para o mecanismo de eletropolimerização do monômero o-PD na superfície do eletrodo modificado GCE-RGO-AuNPs.



Fonte: Adaptado [74]

A reação de polimerização prossegue por meio da inserção de outros cátions radicais, obtidos na primeira etapa, ao dímero formado permitindo assim o crescimento da cadeia até a precipitação do polímero na superfície do eletrodo, assim é de extrema importância promover adequadamente a reação de oxidação do monômero na superfície do eletrodo [73,74].

Nesta etapa também foi preparado um sensor não impresso (GCE-RGO-AuNPs-NIP), realizou-se o processo de polimerização nas mesmas condições experimentais descritas

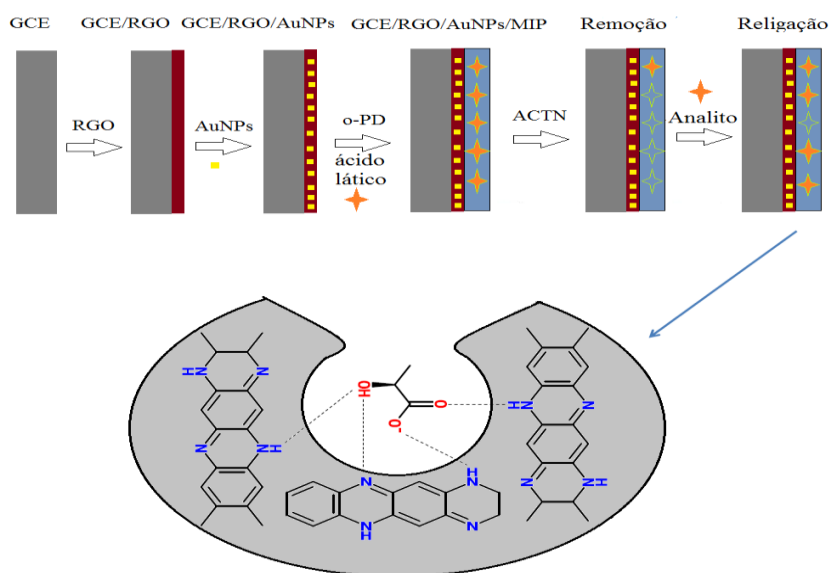
anteriormente, exceto pela presença do ácido láctico, tal procedimento é realizado com o objetivo de confirmar o sucesso da impressão molecular.

Durante o processo de polimerização não foi observada nenhuma diferença significativa entre os voltamogramas cíclicos obtidos na presença de ácido láctico (GCE-RGO-AuNPs-MIP) e na ausência (GCE-RGO-AuNPs-NIP), resultados não apresentados, confirmando dessa maneira que a molécula de ácido láctico não apresenta eletroatividade na faixa de potencial aplicada para a eletropolimerização.

Assim, a estrutura das moléculas do ácido (molécula molde) permanece inalterada durante todo o processo de construção do MIP, o que permite a obtenção de cavidades seletivas para posterior reconhecimento numa amostra complexa.

Um possível processo de impressão molecular para o ácido láctico ($pK_a=3,9$) é descrito na Figura 8, onde é ilustrada a formação de possíveis ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila não dissociado do ácido láctico e o grupo carboxilato com o átomo de hidrogênio do grupo N-H dos monômeros de o-PD e com o átomo de N do anel da o-PD.

Figura 8- Representação do processo de impressão molecular para o ácido láctico na superfície do eletrodo modificado GCE-RGO-AuNPS utilizando o-PD como monômero.



Fonte: elaborado pelo autor

Tais interações são as principais responsáveis pelo processo de religação do ácido láctico, permitindo assim o reconhecimento desse ácido sem interferente numa amostra complexa como é o caso da vinhaça de cana de açúcar.

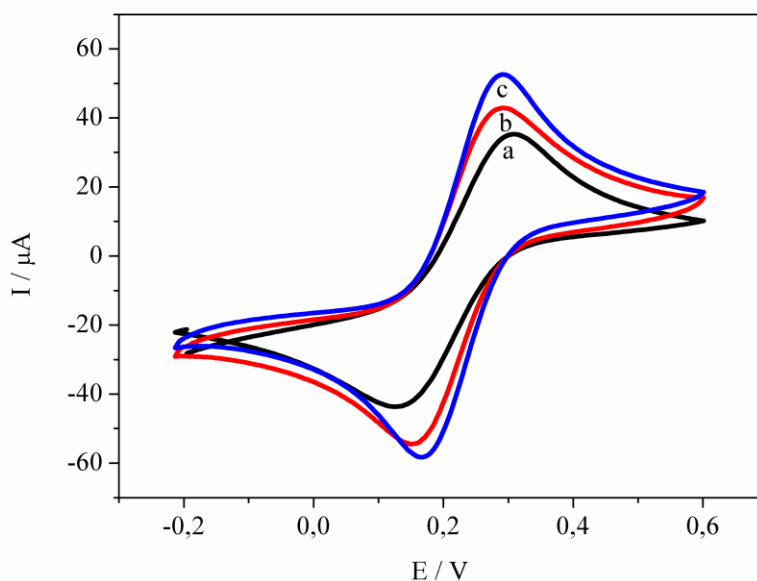
4.1.2 Caracterização do eletrodo GCE-RGO-AuNPs-MIP

4.1.2.1 Caracterização eletroquímica

A etapa de caracterização eletroquímica para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP foi realizada utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

Na Figura 9 são apresentados os resultados obtidos com a técnica de VC para as etapas de modificação do eletrodo de carbono vítreo (GCE), primeiro com óxido de grafeno reduzido (RGO) e em seguida com nanopartículas de ouro (AuNPs), para este estudo foi utilizado o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sonda eletroquímica numa concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para a obtenção da resposta.

Figura 9- Voltamogramas cíclicos para: (a) GCE, (b) GCE-RGO e (c) GCE-RGO-AuNPs, em solução contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, numa velocidade de 50 mV s^{-1} , em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: elaborado pelo autor

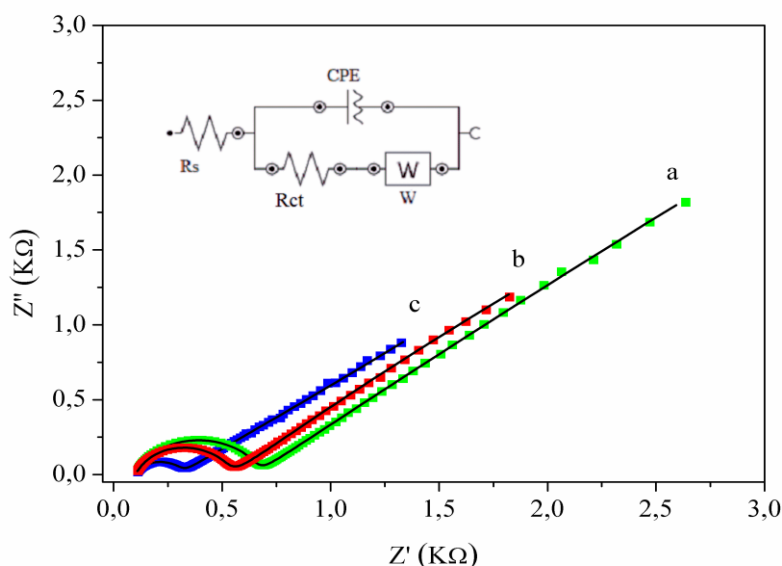
Ao analisar a Figura 9 é possível observar um aumento na corrente de pico para a sonda comparando o eletrodo não modificado GCE (curva a) e o eletrodo após a modificação, inicialmente com RGO (curva b) e depois com AuNPs (curva c).

Esse aumento de corrente estar relacionado com o aumento da condutividade e da área superficial promovida pela presença das AuNPs eletrodepositadas sobre a superfície de RGO, o que facilita o processo de transferência eletrônica para a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ proporcionando assim ao eletrodo modificado uma maior resposta em corrente e consequentemente uma maior sensibilidade para o sensor.

A modificação no eletrodo com RGO e AuNPs também foi estudada por meio da técnica de EIE, a qual é uma técnica que possibilita um estudo completo das propriedades elétricas da interface eletrodo-solução, permitindo identificar e caracterizar os diferentes componentes dessa região de fronteira que podem interferir diretamente na processo de transferência eletrônica [75,76].

Para tal na Figura 10 são apresentados os gráficos de Nyquist obtidos nos estudos de EIE para o eletrodo de GCE (curva a), para o eletrodo modificado GCE-RGO (curva b) e para o eletrodo modificado GCE-RGO-AuNPs (curva c).

Figura 10- Gráficos de Nyquist para: (a) GCE, (b) GCE-RGO e (c) GCE-RGO-AuNPs em solução contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ numa concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Figura interna: Ajuste do circuito elétrico equivalente para os resultados obtidos.



Fonte: elaborado pelo autor

Os resultados de EIE foram inicialmente analisados em termos dos valores da chamada resistência de transferência de carga (R_{tc}), a qual conceitualmente corresponde à resistência a

passagem de corrente para a interface eletrodo solução em estudo. No gráfico de Nyquist da Figura 10, o valor de R_{tc} pode ser obtido a partir do segundo intercepto no eixo real (Z').

Observando os digramas de Nyquist pode-se perceber que os valores de R_{tc} são progressivamente menores quando o eletrodo de GCE ($R_{tc} = 710 \Omega$) é modificado primeiro com RGO ($R_{tc} = 520 \Omega$) e posteriormente com AuNPs ($R_{tc} = 290 \Omega$). Esse comportamento confirma que o processo de transferência eletrônica para a sonda $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, é facilitado quando são realizadas essas modificações na superfície do eletrodo GCE.

Os resultados de EIE obtidos também foram interpretados em termos de circuito elétrico equivalente, o qual permite relacionar os componentes da interface eletrodo-solução com componentes físicos de circuitos elétricos [77].

A inserção da Figura 10 mostra que o circuito elétrico equivalente que melhor representa os resultados obtidos para o sistema em estudo é caracterizado por uma resistência (R_s), a qual está relacionada com a resistência da solução, conectada em serie com um arranjo formado por uma segunda resistência, a resistência de transferência de carga (R_{tc}), conectada em paralelo com um elemento de fase constante (CPE).

O CPE pode representar a capacitância da dupla camada para eletrodos que não apresentam uma superfície completamente plana/polida, não apresentando assim comportamento de capacitor puro [77].

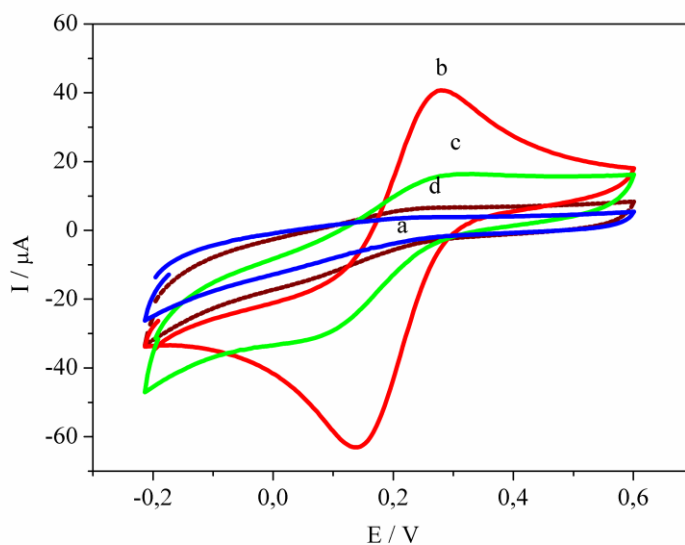
No circuito obtido, R_{tc} está conectado em serie com o ultimo elemento, representado pela chamada impedância de Warburg (W), a qual indica que o processo redox, para a sonda, que ocorre na superfície do eletrodo modificado com RGO e AuNPs é controlado por difusão.

Após esta etapa inicial de modificação do eletrodo GCE com RGO-AuNPs foi realizado o processo de eletropolimerização do monômero o-PD para o preparo do MIP, a seguir na Figura 11 estão apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para a sonda eletroquímica em cada uma das etapas de preparo do MIP.

Analisando a Figura 11 pode-se observar que logo após a polimerização do monômero o-PD para a formação da matriz polimérica: GCE-RGO-AuNPs-MIP (curva a) e GCE-RGO-AuNPs-NIP (curva d) não é possível identificar a presença dos picos redox característicos para sonda $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, esse fato confirma a formação de um filme polimérico compacto e

pouco condutivo na superfície modificada do eletrodo tanto para o MIP como para o NIP após o processo de polimerização.

Figura 11- Voltamogramas cíclicos para: (a) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a polimerização, (b) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a remoção da molécula molde, (c) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a religação com solução de ácido láctico e (d) GCE-RGO-AuNPs-NIP. Utilizando uma solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ numa concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: elaborado pelo autor

O filme polimérico obtido impede a chegada da sonda eletroquímica até a superfície modificada do eletrodo, dificultando assim a ocorrência do processo de transferência eletrônica.

Após a remoção da molécula molde da matriz polimérica foi possível observar novamente a presença dos picos redox característicos da sonda eletroquímica (curva b), indicando que o solvente utilizado no processo de remoção (acetonitrila) permitiu a extração das moléculas de ácido láctico da matriz polimérica de o-PD, possibilitando assim a formação de cavidades no polímero que permitiram o acesso da sonda eletroquímica até a superfície do eletrodo para a ocorrência do processo de transferência eletrônica.

A etapa de religação foi realizada utilizando uma solução de ácido láctico $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 6,0, após 10 minutos de contato do eletrodo com a solução, sob agitação branda, foi possível observar uma diminuição significativa na

intensidade de corrente de pico do par de picos redox (curva c) em comparação com a intensidade observada na “curva b”.

Esse comportamento indica que algumas cavidades impressas do sensor obtidas na etapa de extração, foram ocupadas com sucesso pelas moléculas de ácido láctico na etapa de religação, dificultando assim a chegada da sonda até o eletrodo, confirmando que o processo de formação das cavidades seletivas no MIP e o processo de religação do ácido láctico nessas cavidades foram realizados com sucesso.

As etapas de construção do MIP também foram estudadas utilizando a técnica EIE, da mesma maneira como nas etapas de modificação do eletrodo inicialmente foi utilizado o conceito de resistência para confirmar o sucesso de cada etapa e caracterizá-la eletricamente. A Figura 12 mostra os gráficos de Nyquist obtidos para cada uma das etapas de construção do MIP sobre a superfície modificada do eletrodo GCE-RGO-AuNPs.

Analizando os gráficos de Nyquist da Figura 12 é possível observar o surgimento de uma terceira resistência após o processo de polimerização (terceiro intercepto com eixo Z' no gráfico de Nyquist), confirmada pela inserção superior da mesma Figura 12, a qual demonstra a resposta na região de altas frequências após o processo de polimerização.

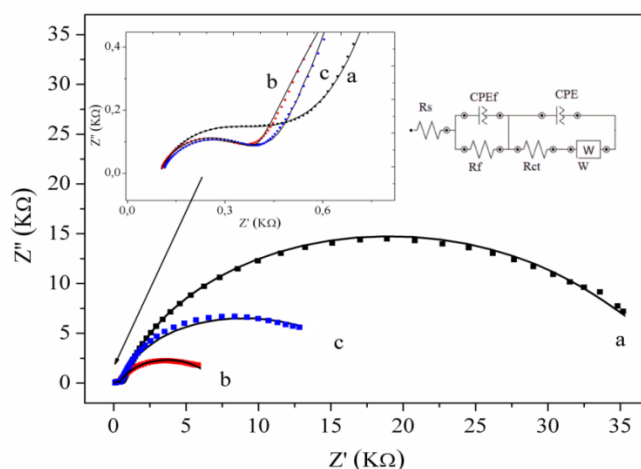
Assim esta terceira resistência tem relação com a resistência imposta pela matriz polimérica formada no eletrodo, a qual dificulta a chegada da sonda até a superfície modificada com RGO-AuNPs, através das cavidades obtidas na etapa de extração, para a ocorrência do processo redox, dessa maneira tal resistência foi relacionada com o conceito de resistência do filme polimérico obtido na superfície do eletrodo [78,79], representada no circuito por R_f .

Na Figura 12 a “curva a” representa o gráfico de Nyquist para o MIP logo após a etapa de polimerização, esta etapa é caracterizada por um elevado valor de resistência de transferência de carga para a sonda ($R_{tc} = 46 \text{ k}\Omega$), o qual tem relação direta com a natureza compacta do filme de o-PD obtido na superfície do eletrodo.

Após o processo de remoção utilizando acetonitrila como solvente, “curva b” no gráfico, pode ser observada uma diminuição significativa para o valor $R_{tc} = 8,3 \text{ k}\Omega$, indicando que a sonda eletroquímica consegue chegar até a superfície do eletrodo com mais facilidade para o processo de transferência eletrônica.

O valor da resistência no interior do filme volta a aumentar após o processo de religação, isso acontece por que algumas cavidades que permitiam a chegada da sonda ate o eletrodo foram ocupadas por moléculas de ácido láctico, ficando assim mais difícil da sonda alcançar a superfície do eletrodo para a transferência eletrônica ($R_{tc} = 23,7 \text{ k}\Omega$) curva c.

Figura 12- Gráficos de Nyquist para: (a) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a polimerização, (b) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a remoção da molécula molde e (c) após a religação com uma solução de ácido láctico. Utilizando uma solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ numa concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ como sonda eletroquímica, em $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: elaborado pelo autor

Do mesmo modo como nas etapas de modificação do eletrodo com RGO e AuNPS os resultados obtidos para cada uma das etapas de construção do MIP também foram interpretados em termos de circuito elétrico equivalente.

O circuito que melhor representou os dados experimentais obtidos está na inserção da Figura 12, onde é possível observar a presença de uma resistência (R_s) conectada em serie com um arranjo formado por uma resistência R_f , relacionada com a resistência do filme de o-PD obtido, a qual está conectada em paralelo com um elemento de fase constante CPE_f . Este arranjo está conectado com um segundo, formado por CPE conectado em paralelo com R_{tc} , o qual está conectado do em serie com a impedância de Warburg (W).

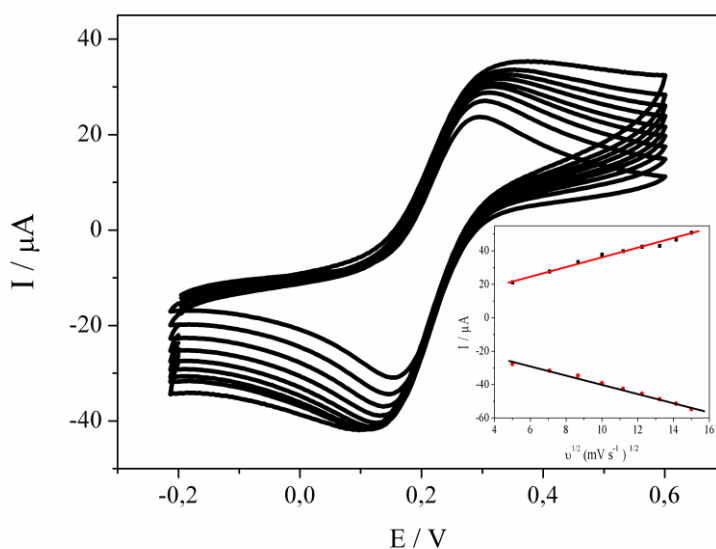
Tal comportamento sugere que após a etapa de polimerização do MIP e remoção da molécula molde o processo de transferência eletrônica para a sonda eletroquímica continua a ser controlado por difusão ate a superfície do eletrodo.

Como última caracterização eletroquímica a técnica de VC também foi utilizada para investigar a natureza dos processos eletródicos que ocorrem no eletrodo GCE-RGO-AuNPs-MIP, com o objetivo de confirmar os resultados preliminares obtidos nos estudos de EIE, para tal foram realizados estudos sobre o efeito da velocidade de varredura na intensidade das correntes de pico do sensor após o processo de remoção da molécula molde.

Como pode ser observado na Figura 13, as correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) aumentam com o aumento da velocidade de varredura num intervalo de 25 a 250 mV s^{-1} , de modo que os valores de I_{pa} e I_{pc} variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

A relação matemática para tal pode ser expressa como: $I_{pa} (\text{A}) = 2,72 \times 10^{-6} v^{1/2} + 8,33 \times 10^{-6}$ ($r = 0,9982$) e $I_{pc} (\text{A}) = -2,74 \times 10^{-6} v^{1/2} - 1,23 \times 10^{-5}$ ($r = 0,9987$), esse comportamento indica que o sensor eletroquímico desenvolvido (GCE-RGO-AuNPs-MIP) apresenta um processo eletródico para a sonda controlado por difusão [51], confirmando assim os resultados obtidos preliminarmente pela técnica EIE, apresentados anteriormente nas Figuras 10 e 12.

Figura 13- Voltamogramas cíclicos para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP após a remoção da molécula molde em diferentes velocidades de varredura, utilizando solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ como sonda eletroquímica, em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Inserção: relação entre as correntes de pico anódica e catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

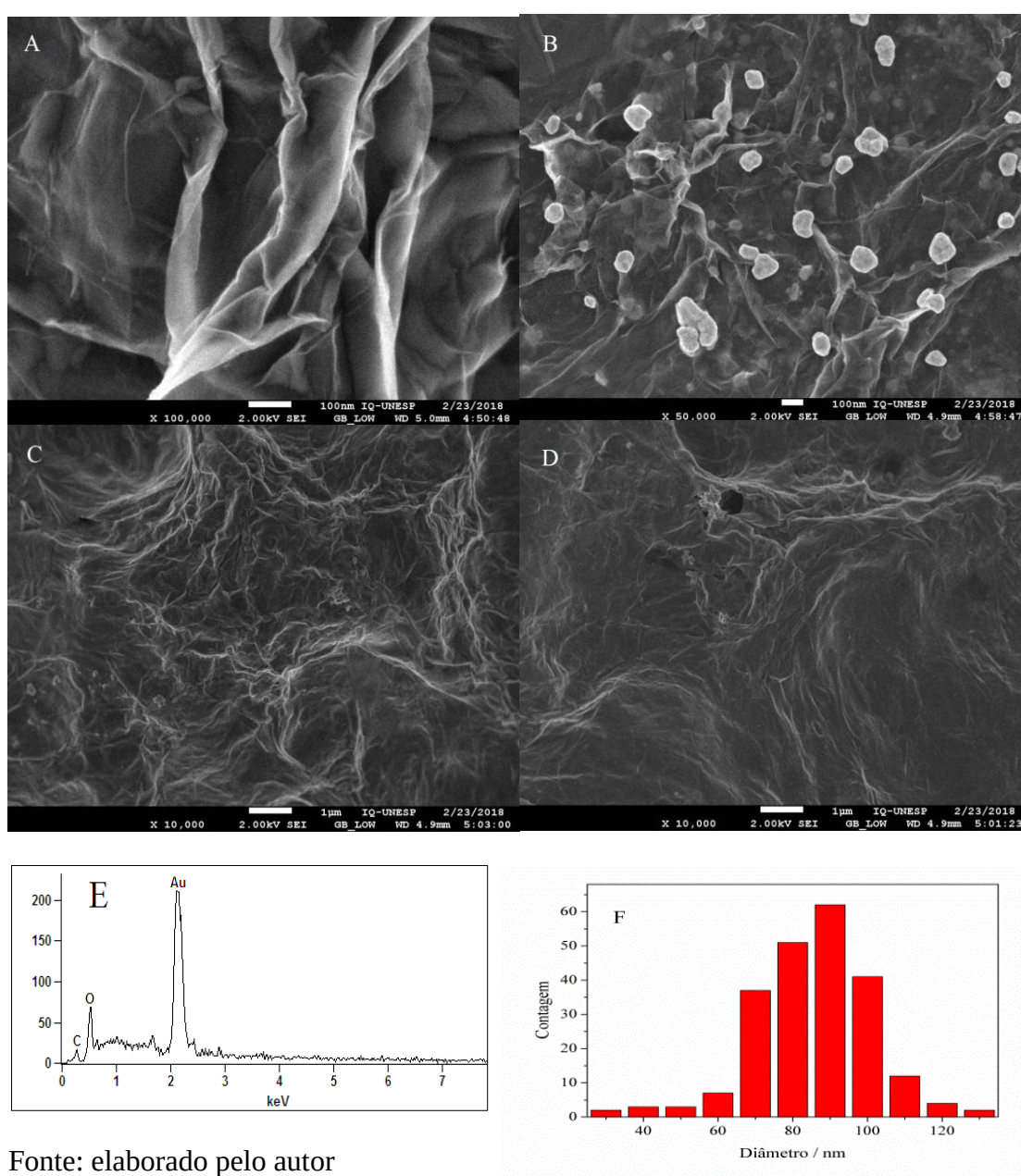


Fonte: elaborado pelo autor

4.1.2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP foi realizada através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, utilizando um equipamento com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (MEV-FEG), os resultados obtidos estão apresentados na Figura 14.

Figura 14- Imagens MEV-FEG para: (A) GCE-RGO, (B) GCE-RGO-AuNPs, (C) GCE-RGO-AuNPs-MIP, (d) GCE-RGO-AuNPs-NIP, (E) Espectro de EDX para GCE-RGO-AuNPs e (F) Variação do diâmetro médio das AuNPs.



Fonte: elaborado pelo autor

A Figura 14A apresenta as imagens MEV-FEG obtidas para GCE-RGO demonstrando o aspecto “enrugado” característico para as nanofolhas de grafeno eletrodepositadas na superfície do eletrodo de GCE, essa organização espacial característica é responsável pelo aumento da área superficial do eletrodo anteriormente destacada.

A Figura 14B mostra os resultados para GCE-RGO-AuNPs, sendo possível observar claramente a formação das nanopartículas metálicas na superfície do eletrodo modificado com as nanofolhas de RGO. As AuNPs apresentaram diâmetro médio de $90,0 \pm 15,0$ nm, o espectro de EDS apresentado na Figura 14E confirma a presença de ouro na superfície do eletrodo e a Figura 14F mostra o diâmetro médio das nanopartículas obtidas.

As imagens obtidas após a polimerização do monômero o-PD para a obtenção GCE-RGO-AuNPs-MIP são apresentadas na Figura 14C e para a formação do GCE-RGO-AuNPs-NIP na Figura 14D, sendo possível observar claramente a formação da matriz polimérica sobre a superfície modificada do eletrodo em ambos os casos, confirmando o sucesso na etapa de eletropolimerização.

4.1.3 Estudo dos parâmetros para a construção do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP

Para alcançar sucesso no desenvolvimento de um sensor eletroquímico baseado em MIP (GCE-RGO-AuNPs-MIP) como elemento de reconhecimento o estudo dos parâmetros experimentais para a obtenção do MIP na superfície do eletrodo é de extrema importância.

O desempenho analítico do sensor será influenciado diretamente pelas condições experimentais utilizadas no processo de eletropolimerização e nas etapas de remoção da molécula molde e religação do analito durante a construção do MIP.

Os parâmetros estudados no presente trabalho foram: pH e número de ciclos voltamétricos para eletropolimerização, razão entre as concentrações molares do monômero funcional (o-PD) e da molécula molde (ácido láctico), tempo de remoção da molécula molde, tempo e pH para o processo de religação do analito, além da seleção do solvente adequado para a etapa de remoção.

Esses parâmetros interferem na espessura do filme polimérico obtido na superfície do eletrodo, na sua estabilidade química e física e na distribuição e uniformidade dos sítios seletivos de reconhecimento, o que tem influência direta no desempenho analítico do sensor.

Nessa etapa de otimização das condições experimentais para a construção do MIP foi utilizada a técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) para a obtenção do sinal analítico a partir da oxidação da sonda eletroquímica. Os experimentos foram realizados em meio de KCl 0,10 mol L⁻¹.

O sinal analítico obtido é baseado na variação de corrente de pico (ΔI), calculada pela diferença entre a corrente de pico medida para a oxidação da sonda eletroquímica imediatamente após a remoção da molécula molde e a corrente de pico medida para a oxidação da sonda após religação das moléculas do analito nas cavidades seletivas do MIP, conforme descrito na Equação 1.

$$\Delta I = (I_{\text{após remoção}}) - (I_{\text{após religação}}) \quad \text{Equação (1)}$$

4.1.3.1 Efeito do número de ciclos voltamétricos aplicados para a eletropolimerização

O número de ciclos voltamétricos aplicados para o processo de polimerização na superfície do eletrodo afeta diretamente a sensibilidade e estabilidade do sensor, nesta etapa foram estudados 15, 20, 25, 30 e 35 ciclos voltamétricos para a eletropolimerização da o-PD, numa velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

De acordo com a Figura 15 pode ser observado que os melhores resultados para a polimerização da o-PD na presença de ácido láctico foram obtidos aplicando 25 ciclos voltamétricos sucessivos.

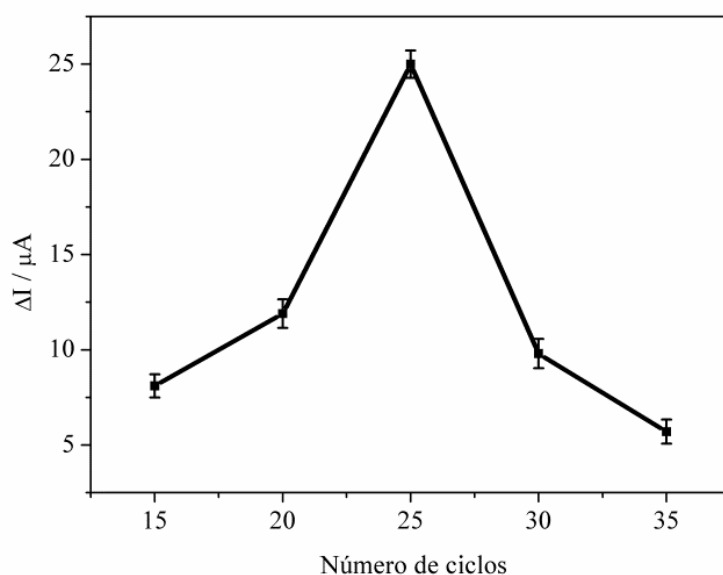
Quando esse número foi maior que 25 a resposta em variação de corrente para o MIP apresentou uma queda significativa, provavelmente por que nessas condições foi obtido um filme polimérico muito espesso na superfície do eletrodo, assim moléculas de ácido láctico impressas no interior da matriz polimérica podem não ter sido totalmente removidas, formando um número menor de sítios seletivos de reconhecimento, dificultando a chegada da sonda até a superfície do eletrodo [67].

Por outro lado quando o número de ciclos foi menor que 25 também foi observada uma resposta menor em variação de corrente para o sensor, isso acontece porque nessa situação o filme polimérico obtido apresenta uma espessura inferior, sendo formado assim um número

menor de sítios de reconhecimento, pode apresentar também uma elevada rugosidade favorecendo assim processos de adsorção não específicos, levando a uma menor taxa de religação para o analito.

Desse modo foi selecionado o número de 25 ciclos sucessivos como o número ótimo de ciclos voltamétricos para a eletropolimerização do monômero o-PD na presença de ácido láctico sobre a superfície modificada GCE-RGO-AuNPs para a construção do MIP.

Figura 15- Resposta em variação de corrente para o efeito do número de ciclos voltamétricos na eletropolimerização do monômero o-PD numa concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ácido láctico numa concentração de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



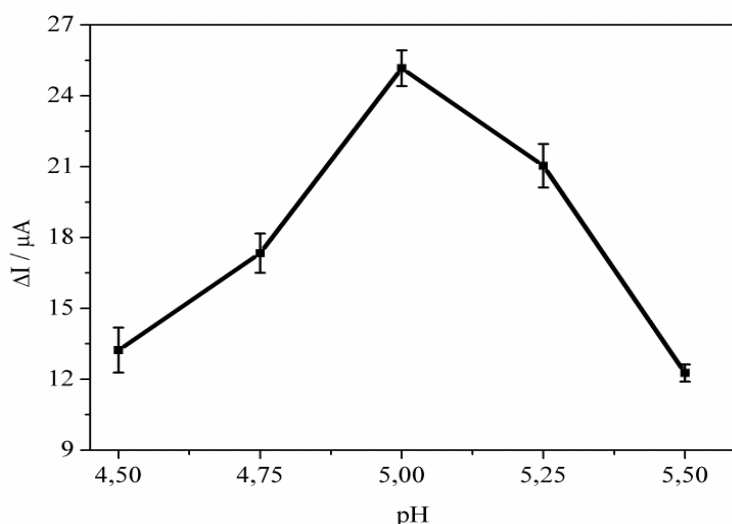
Fonte: elaborado pelo autor

4.1.3.2 Influência do pH do meio no processo de eletropolimerização da o-PD

Outro fator que tem demonstrado influência direta no desempenho de MIPs obtidos com o-PD é o pH da solução utilizada como meio para promover o processo de polimerização deste monômero, uma vez que o meio tem participação importante na formação dos radicais que desencadeiam o processo de polimerização na superfície do eletrodo.

Para este trabalho o estudo foi realizado em soluções de tampão PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com valores de pH variando de 4,50 a 5,50, os resultados obtidos para o estudo estão apresentados na Figura 16.

Figura 16- Resposta em variação de corrente para o efeito do valor do pH da solução utilizada como meio para a eletropolimerização do monômero o-PD numa concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ácido láctico numa concentração de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando 25 ciclos voltamétricos.



Fonte: elaborado pelo autor

A literatura tem demonstrado que os melhores resultados para a polimerização da o-PD são obtidos em meios que apresentam pH ácido, isso porque nesses meios os grupos $-NH_2$ das moléculas de o-PD apresentam a capacidade de condensação com outras moléculas de o-PD promovendo assim o crescimento da cadeia polimérica [74].

Analisando os dados obtidos observa-se que a maior resposta em variação de corrente foi alcançada para o pH 5,0, assim esse valor de pH foi selecionado para a polimerização do monômero e construção do sensor.

4.1.3.3 Efeito da razão molar entre ácido láctico e o-PD

A razão molar entre o monômero funcional e a molécula molde irá influenciar diretamente no número de sítios impressos de reconhecimento formados durante o processo de polimerização, assim este é outro parâmetro que deve ser cuidadosamente estudado.

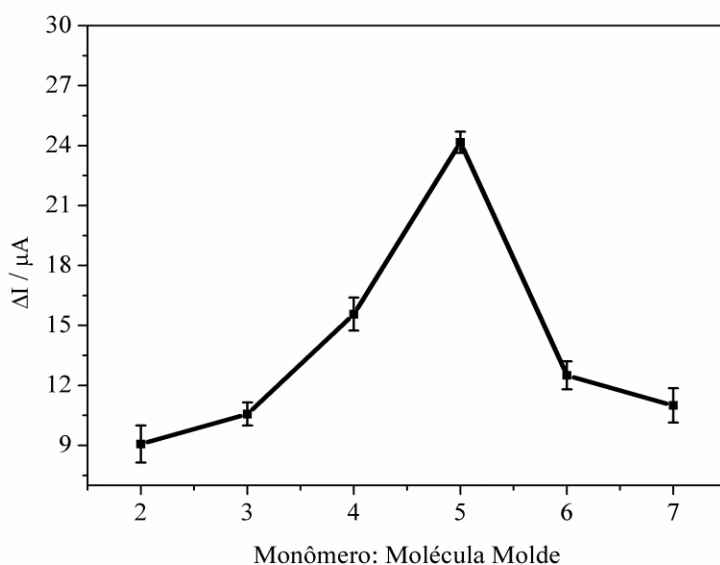
De modo geral é utilizado um excesso de monômero funcional em comparação com a molécula molde, pois isso permite a obtenção de mais sítios de religação para o analito no polímero formado. No entanto se esta razão for excessivamente grande pode ocorrer à formação de sítios de reconhecimento não seletivos no polímero pelo excesso de grupos

funcionais do monômero, o que pode levar a processos de religação não específicos no MIP, afetando assim a seletividade do sensor [80].

No presente trabalho a razão molar de o-PD para o ácido lático (molécula molde) foi estudada no intervalo de 2:1 a 7:1, para tal a concentração de o-PD foi mantida em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ variando-se a concentração de ácido lático (molécula molde), os resultados obtidos são mostrados na Figura 17.

Analisando a Figura 17 pode-se observar que a razão molar que apresentou melhor resposta em variação de corrente para o sensor foi 5:1 (o-PD: ácido lático), indicando que nessas condições um número maior de cavidades seletivas que permitem um processo de religação para o ácido são obtidas, assim esta razão molar foi selecionada para a construção do sensor.

Figura 17- Resposta em variação de corrente para o efeito da razão molar entre o ácido lático (molécula molde) e o-PD (monômero) na eletropolimerização, para uma concentração do monômero de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando 25 ciclos voltamétricos, em tampão PBS pH 5,0.



Fonte: elaborado pelo autor

Quando o valor para a razão foi menor que 5:1 a resposta apresentou uma queda significativa, isso acontece porque possivelmente nessa situação a quantidade de o-PD presente não foi suficiente para se combinar com todas as moléculas de ácido lático adicionadas, sendo formado assim um número reduzido de sítios seletivos.

Quando a razão foi maior que 5:1 a quantidade excessiva de o-PD presente pode ter dificultado o processo de remoção da molécula molde e até mesmo obstruído alguns sítios seletivos formados na etapa de remoção, dificultando assim o processo de reconhecimento na etapa de religação.

4.1.3.4 Efeito do tempo de extração da molécula molde

A grande vantagem de se trabalhar com MIP é a seletividade superior oferecida por esses materiais, assim uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de um MIP é a obtenção da cavidade seletiva para o futuro reconhecimento do analito, isso acontece na etapa de remoção da molécula molde impressa na matriz polimérica durante a eletropolimerização.

A etapa de remoção também é importante para garantir uma boa sensibilidade para o sensor, a qual tem relação direta com o número e a uniformidade dos sítios seletivos de reconhecimento obtidos.

O método mais utilizado para remoção da molécula molde é a extração por solvente, nesse método a interação com o solvente promove o intumescimento ou inchaço do polímero impresso na superfície do eletrodo.

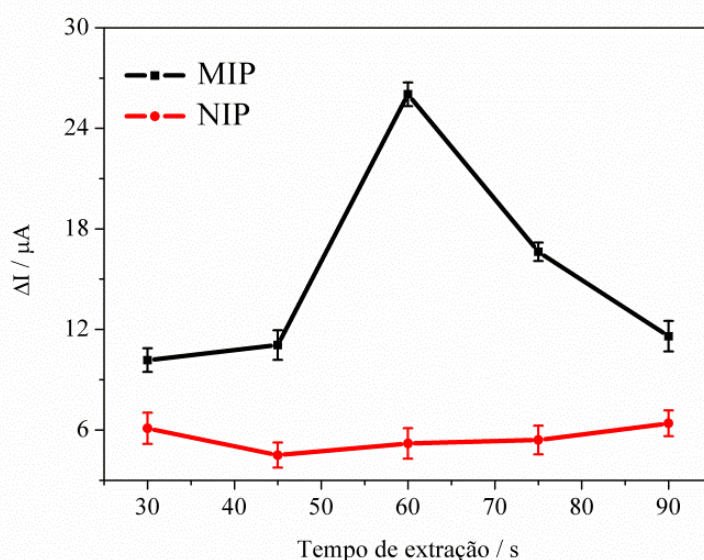
Tal interação facilita o processo de enfraquecimento e ruptura das ligações de hidrogênio e/ou outras interações estabelecidas entre os grupos funcionais do polímero e os grupos funcionais da molécula molde, possibilitando assim a saída desta última sem causar danos à estrutura física do polímero.

Para este estudo, a acetonitrila foi selecionada, isso pelo fato deste solvente não interagir quimicamente com o polímero e apresentar a capacidade de solubilizar as moléculas de ácido láctico.

Para comprovar o processo de impressão molecular, o tempo de remoção em termos da variação de corrente também foi estudado para o sensor não impresso GCE-RGO-AuNPs-NIP. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 18, juntamente com os resultados para o sensor impresso (GCE-RGO-AuNPs-MIP), onde foram estudados tempos de contato com o solvente para a remoção no intervalo de 30 a 90 segundos, sob agitação branda (aproximadamente 50 rpm).

Ao analisar a Figura 18 podemos observar que os valores de variação de corrente para o sensor impresso GCE-RGO-AuNPs-MIP são claramente maiores que os valores de variação de corrente para o sensor não impresso GCE-RGO-AuNPs-NIP.

Figura 18- Resposta em variação de corrente para o efeito do tempo de extração da molécula molde para o sensor impresso GCE-RGO-AuNPs-MIP e não-impresso GCE-RGO-AuNPs-NIP.



Fonte: elaborado pelo autor

Tal comportamento confirma a obtenção de cavidades seletivas no MIP que permitem um processo de religação para o analito após a remoção da molécula molde, no caso do NIP como não ocorre remoção de nenhuma molécula de ácido láctico impressa não ocorre também a formação de cavidades, assim a sonda eletroquímica não consegue chegar até a superfície do eletrodo para a transferência eletrônica.

O sensor apresentou um máximo de resposta em variação de corrente após o tempo de contato de 60 segundos, confirmando que este tempo é suficiente para remover as moléculas de ácido láctico da matriz polimérica.

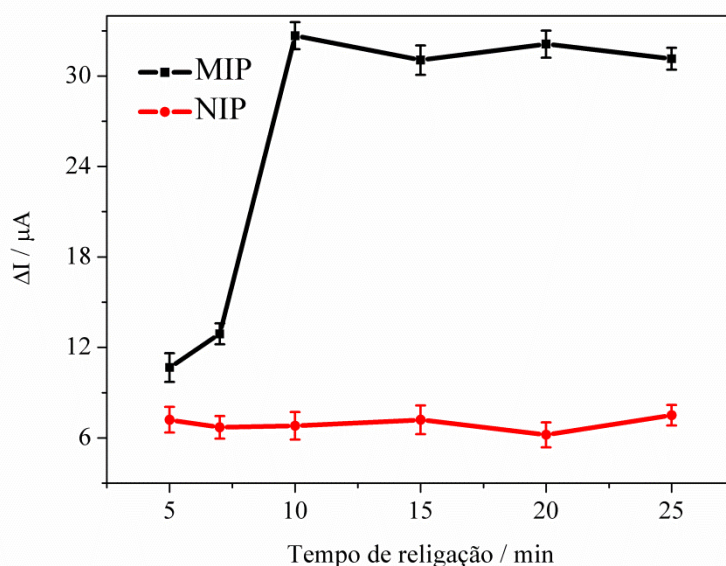
Em tempos de contato superiores a queda na resposta em variação de corrente pode ser relacionada com um inchaço excessivo do polímero, o que pode ter bloqueado a superfície do eletrodo para a chegada da sonda.

Por outro lado, em tempos inferiores o tempo de contato pode não ter sido suficiente para enfraquecer todas as interações da molécula molde com o polímero, formando assim um número menor de cavidades, desse modo o tempo de 60 segundos foi selecionado para a remoção das moléculas de ácido láctico em meio de acetonitrila sob agitação branda (aproximadamente 50 rpm).

4.1.3.5 Influência do tempo de religação

Após a etapa de remoção da molécula molde da matriz polimérica foi realizado o estudo do tempo de religação das moléculas do analito nas cavidades obtidas, este estudo é importante para avaliar a cinética de religação das moléculas de ácido láctico. Foram estudados diferentes tempos de contato do eletrodo com a solução de ácido láctico para a religação no intervalo de 5 a 25 minutos, os resultados obtidos são apresentados na Figura 19.

Figura 19- Influência do tempo de religação do ácido láctico, numa concentração de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, na resposta em variação do sensor impresso GCE-RGO-AuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-AuNPs-NIP.



Fonte: elaborado pelo autor

Ao analisar a Figura 19 observa-se que a partir do tempo de 10 minutos foi obtida uma resposta constante em variação de corrente para o sensor, indicando que foi alcançada uma condição estacionária para a religação das moléculas do analito nas cavidades seletivas de reconhecimento da matriz polimérica, assim esse foi o tempo selecionado para o desenvolvimento do sensor.

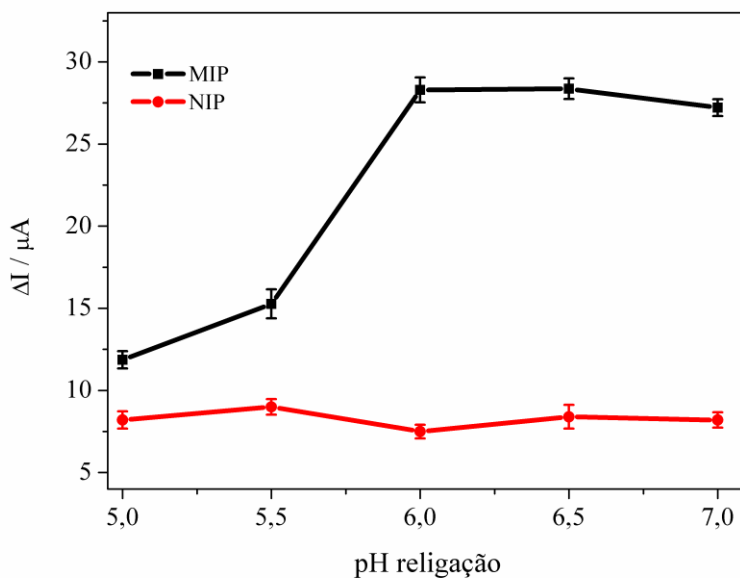
Ainda analisando a Figura 19 pode ser observado que a resposta em variação de corrente para o GCE-RGO-AuNPs-NIP é consideravelmente menor quando comparada com a resposta do GCE-RGO-AuNPs-MIP, reforçando mais uma vez o sucesso no processo de impressão molecular.

Essa resposta baixa em variação de corrente está mais uma vez relacionada com a não formação de sítios seletivos de reconhecimento na etapa de remoção, os quais permitiriam a chegada da sonda até o eletrodo e um posterior processo de religação para as moléculas de ácido láctico, possibilitando assim o cálculo de variação de corrente para a sonda.

4.1.3.6 Efeito do pH do meio no processo de religação

Outro parâmetro estudado para o desenvolvimento do sensor impresso GCE-RGO-AuNPs-MIP foi o efeito do pH da solução utilizada para realizar o processo de religação das moléculas de ácido láctico, os resultados obtidos estão apresentados Figura 20.

Figura 20- Influência do pH do meio na resposta em variação de corrente para o sensor impresso GCE-RGO-AuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-AuNPs-NIP



Fonte: elaborado pelo autor

Este estudo é importante pelo fato da solução utilizada como meio poder apresentar a capacidade de interagir com os grupos $-NH_2$ livres das cavidades impressas no polímero, os quais são os principais responsáveis pelo processo de religação para as moléculas de ácido láctico.

A literatura mostra que o processo de religação para polímeros obtidos com o-PD acontece preferencialmente em valores de pH próximos da neutralidade, assim para o presente trabalho foram estudados diferentes valores de pH num intervalo de 5,0 a 7,0.

Como observado na Figura 20 a partir do pH 6,0 a resposta para o sensor alcançou um valor constante, indicando que esse valor de pH para o meio é adequado para o processo de religação.

4.1.4 Caracterização morfológica da superfície do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP

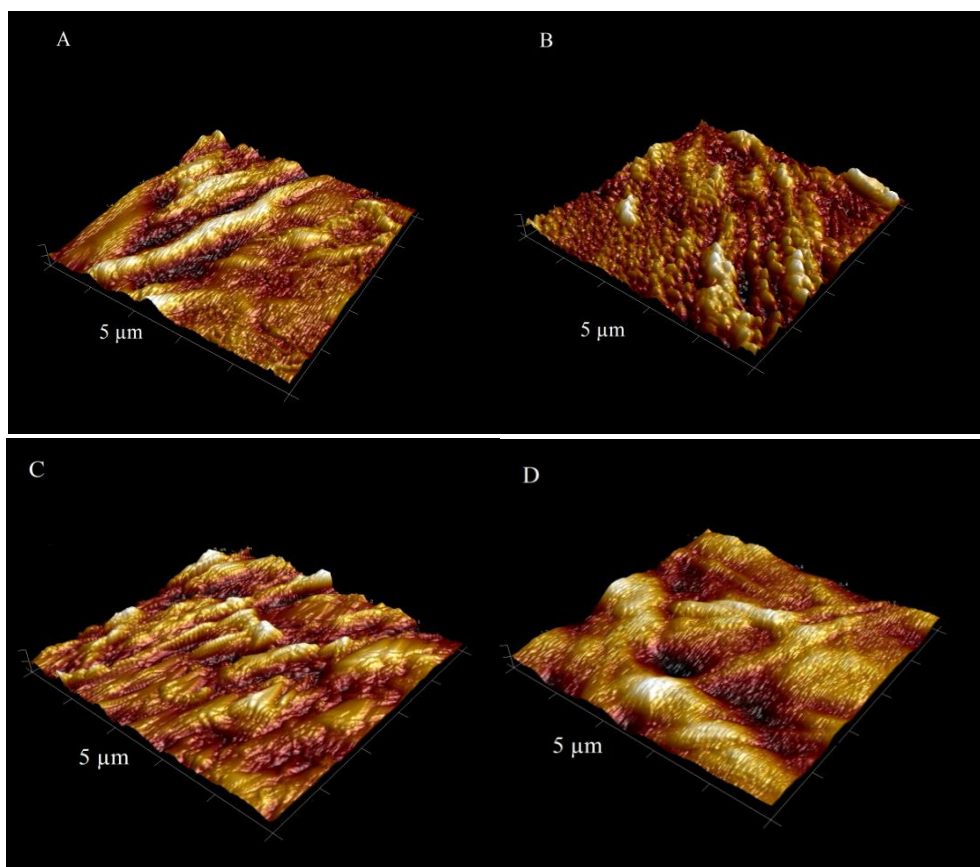
Após a otimização de todos os parâmetros experimentais realizou-se uma caracterização morfológica da superfície do sensor para cada uma das etapas de construção do MIP com o objetivo de investigar alguma mudança na superfície do eletrodo modificado.

A análise da superfície do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP foi realizada utilizando a técnica de microscopia de força atômica (AFM). As imagens obtidas por essa técnica permitem analisar uma série de fatores de interesse durante o processo de impressão molecular, baseados em informações relacionadas à rugosidade do filme polimérico obtido, a qual pode ser avaliada em termos das variações observadas nos valores de RMS (root-mean-square).

As imagens tridimensionais de AFM obtidas durante as etapas de preparo do sensor são apresentadas na Figura 21. A Figura 21A, obtida para o sensor após o processo de polimerização do monômero o-PD apresentou um valor para RMS=43,9 nm, após a remoção da molécula molde, Figura 21B, para a obtenção das cavidades seletivas observa-se um aumento significativo no valor de RMS= 64,9 nm, justificado pelo inchaço causado no polímero e consequente formação das cavidades seletivas de reconhecimento.

Após o processo de religação, Figura 21C, foi observada uma diminuição na rugosidade do filme RMS=51,7 nm, indicando que ocorreu uma diminuição no inchaço do polímero e que as cavidades impressas foram ocupadas. Para o GCE-RGO-AuNPs-NIP, Figura 21D, valores menores de rugosidade foram encontrados quando comparados com o GCE-RGO-AuNPS-MIP, RMS=31,4 nm, o que pode ter relação com a ausência das moléculas molde durante o processo de polimerização.

Figura 21- Imagens AFM para: (A) GCE-RGO-AuNPs-MIP após a polimerização, (B) GCE-RGO-AuNPs-MIP após remoção, (C) GCE-RGO-AuNPs-MIP após religação e (D) GCE-RGO-AuNPs-NIP



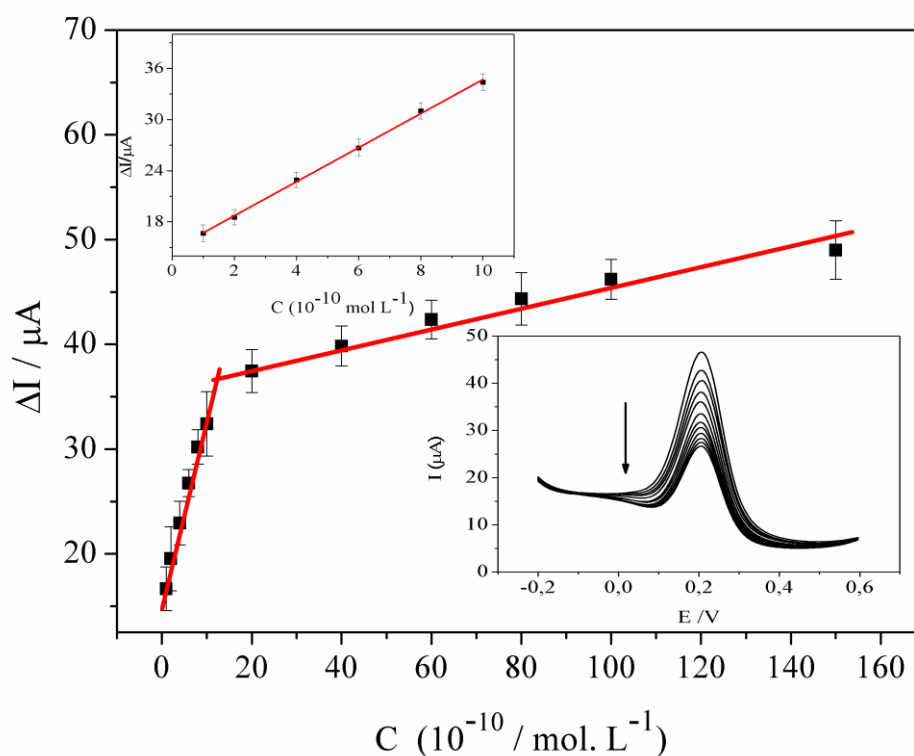
Fonte: elaborado pelo autor

4.1.5 Performance analítica do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP

Após a preparação e caracterização do sensor sob as condições otimizadas, foram obtidas curvas analíticas, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV), para avaliar o desempenho analítico do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP na determinação de ácido láctico, a curva obtida após sucessivas religações para o analito é apresentada na Figura 22.

Após a remoção da molécula molde de ácido láctico impressa no filme polimérico de o-PD o sensor foi submetido a sucessivos processos de religação utilizando soluções de diferentes concentrações de ácido láctico em tampão PBS com pH 6,0 por um tempo de 10 minutos de contato sob agitação branda (aproximadamente 50 rpm), após cada religação foi medida a corrente para a oxidação da sonda eletroquímica para o cálculo da variação de corrente (ΔI), a partir da Equação 1 e posterior construção da curva.

Figura 22- Curva analítica para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP obtida em soluções com diferentes concentrações de ácido láctico em tampão PBS pH 6,0 para a religação, com tempo de remoção de 60 segundos e tempo de religação de 10 minutos. Figura interna superior: primeira região linear do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP para um intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de ácido láctico. Figura interna inferior: voltamogramas DPV para a sonda após a religação do ácido láctico no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.



Fonte: elaborado pelo autor

A inserção inferior da Figura 22 mostra uma diminuição progressiva da corrente de pico para a resposta da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ com o aumento da concentração de ácido láctico. Isso indica que um número maior de cavidades impressas no MIP estão progressivamente sendo ocupadas com o aumento da concentração de ácido láctico, dificultando assim a chegada da sonda até a superfície modificada do eletrodo para a transferência eletrônica.

A Figura 22 mostra também que a resposta em corrente para a sonda eletroquímica é proporcional à concentração de ácido láctico em duas faixas de concentrações para a religação do analito: a primeira faixa linear vai de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e a segunda de $2,0 \times 10^{-9}$ a $1,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

As figuras de mérito para o sensor foram calculadas utilizando a primeira faixa de concentrações, a qual apresentou a seguinte equação de correlação linear: $\Delta I = 1,98 \times 10^5 C_{\text{ácido láctico}} (\text{mol L}^{-1}) + 1,48 \times 10^{-5}$, foram calculados os valores de sensibilidade amperométrica, limite de detecção ($LD=3s/\text{slope}$) para $n=3$, limite de quantificação ($LQ=10s/\text{slope}$) para $n=3$, com $1,9 \times 10^5 \text{ mA L mol}^{-1}$, $8,9 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,9 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

A Tabela 1, mostra uma comparação entre o sensor desenvolvido GCE-RGO-AuNPs-MIP para a determinação de ácido láctico com outros sensores disponíveis na literatura para a determinação de ácido láctico, sendo possível observar que o sensor desenvolvido no presente trabalho apresentou menores valores para LD e LQ e uma ampla faixa linear.

Tabela 1- Comparação entre os sensores disponíveis na literatura para determinação de ácido láctico com o sensor desenvolvido no presente trabalho

Método de detecção	Intervalo linear (mol L^{-1})	Limite de detecção (mol L^{-1})	Referência
Gold electrode	$5.0 \times 10^{-6} - 340 \times 10^{-6}$	0.96×10^{-6}	[59]
NiO and Ni(OH)	$1.0 \times 10^{-5} - 3.27 \times 10^{-2}$	$5,3 \times 10^{-4}$	[60]
ZnO nanorods	$1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-3}$	1.0×10^{-7}	[61]
MIP/MWCNTs/PVC	$1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-1}$	7.3×10^{-7}	[66]
Nafion/Lox/(PPy-F127)/GCE	$1.5 \times 10^{-5} - 3.75 \times 10^{-5}$	8.8×10^{-6}	[62]
GCE-RGO-AuNPs-MIP	$1.0 \times 10^{-10} - 1.5 \times 10^{-8}$	$8,9 \times 10^{-11}$	Este trabalho

A existência de duas faixas lineares em sensores baseados em MIP é um fato reportado com frequência na literatura, isso acontece devido à presença de cavidades de reconhecimento no MIP com diferentes afinidades pela molécula do analito.

Assim quando o MIP é imerso numa solução de ácido láctico suas moléculas vão ocupar as cavidades mais superficiais, as quais apresentam maior afinidade pelas moléculas do ácido, à medida que a concentração aumenta todas as cavidades localizadas na fração mais superficial do MIP são ocupadas.

Nessa situação as moléculas do ácido procuram cavidades mais internas na matriz polimérica, as quais apresentam uma menor afinidade para a ligação, principalmente por conta das dificuldades difusionais que analito precisa superar no interior da matriz polimérica para alcançar as cavidades de ligação mais internas.

Assim a diminuição do coeficiente angular da curva, com o aparecimento de uma segunda faixa linear, tem relação com as dificuldades de transferência de massa que as moléculas do ácido láctico precisam superar no interior da matriz polimérica para alcançar uma cavidade de reconhecimento.

4.1.6 Estudos de isoterma de adsorção

Com o objetivo de estudar as propriedades de ligação das moléculas de ácido láctico nas cavidades do MIP foi realizado um estudo de adsorção, aplicando a isoterma de Langmuir, o chamado parâmetro de equilíbrio, dado pela constante de dissociação do equilíbrio (K_d) pode ser calculado a partir da Equação 2, [81,82], permitindo assim um estudo quantitativo das interações responsáveis pelo reconhecimento seletivo do MIP:

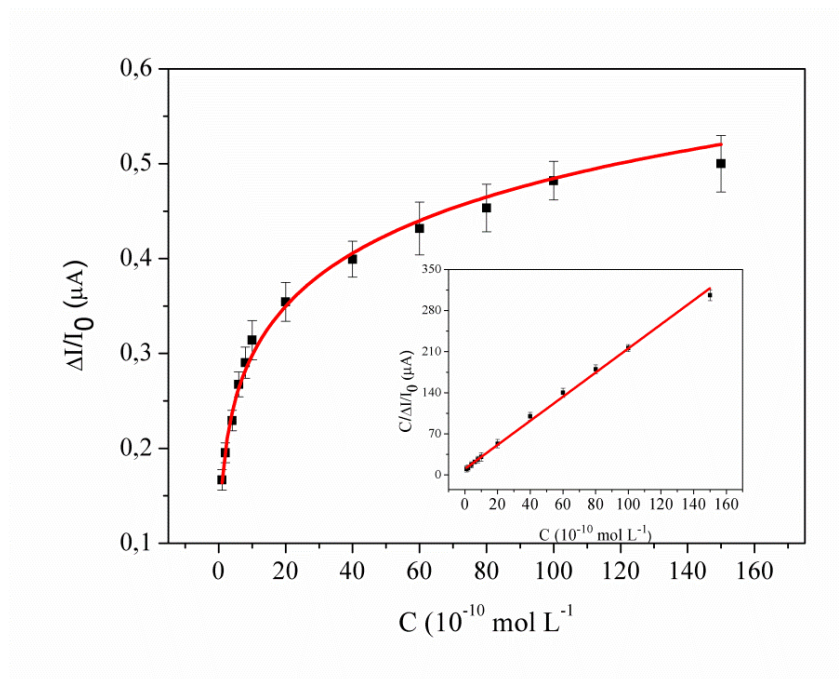
$$\frac{\Delta I}{I_0} = \frac{B_{max} C}{K_d + C} + N_s C \quad \text{Equação 2}$$

Onde C é a concentração do analito na solução, B_{max} é o número máximo de sítios de ligação no MIP, K_d a constante de dissociação do equilíbrio e N_s representando a constante de ligação para a adsorção não específica.

A Figura 23 mostra a isoterma obtida para o intervalo de concentrações de ácido láctico estudado na construção do sensor.

O valor de K_d obtido foi de $4,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($R = 0,9972$), tal valor sugere que o ácido láctico exibiu uma alta afinidade para os sítios seletivos de reconhecimento obtidos no MIP desenvolvido, permitindo assim um processo de reconhecimento seletivo e com elevada estabilidade [82].

Figura 23- Isoterma de adsorção para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP. Figura interna: curva linearizada para a adsorção do ácido láctico.



Fonte: elaborado pelo autor

4.1.7 Estudo de interferentes

Os sensores baseados em MIP são seletivos para o reconhecimento específico da molécula de interesse, geralmente utilizada como molde na etapa de impressão molecular para a obtenção das cavidades de reconhecimento. Esse reconhecimento por sua vez se deve principalmente ao tamanho da molécula e a presença de grupos funcionais nessa molécula capazes de interagir com os grupos funcionais presentes no polímero.

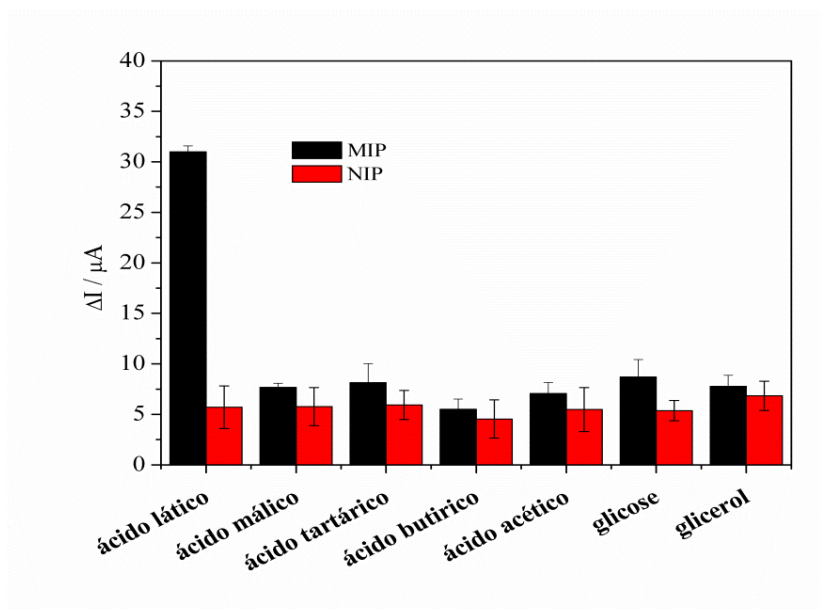
Dessa maneira moléculas que possuem os mesmos grupos funcionais e tamanhos semelhantes às moléculas do analito podem atuar como interferentes na resposta em variação de corrente para o sensor durante o processo de reconhecimento molecular, visto que podem ocupar algumas cavidades obtidas no MIP.

Na Figura 24 são apresentadas as respostas em intensidade de corrente do sensor para algumas moléculas que podem atuar como interferentes e são encontradas na vinhaça de cana de açúcar, utilizando para tal as mesmas condições aplicadas para o ácido láctico.

Com base na análise a Figura 24 é possível observar que o sensor apresenta boa seletividade para o ácido láctico, visto que as respostas em variação de corrente são

aproximadamente 5 vezes maiores quando comparadas com as respostas obtidas após a etapa de religação para os potenciais contaminantes presentes na vinhaça de cana de açúcar, reafirmando a elevada afinidade das cavidades seletivas pelas moléculas de ácido láctico

Figura 24- Estudo de interferentes para o sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP



Fonte: elaborado pelo autor

Esse comportamento comprova que as condições de impressão molecular, remoção da molécula molde e religação descritas para a construção do MIP foram adequadas para a obtenção de cavidades altamente seletivas para o reconhecimento do analito, com boas respostas em variação de corrente.

A seletividade do sensor foi avaliada numericamente através do chamado fator de impressão molecular (α) e do chamado fator de seletividade (β), como mostram as equações 3 e 4 [43].

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

$$\beta = \frac{\alpha \text{ ácido láctico}}{\alpha \text{ interferente}} \quad \text{Equação 4}$$

Os valores para essas duas grandezas foram calculados para todas as moléculas estudadas como interferentes e são mostrados na Tabela 2.

O fator de impressão, α , tem relação com a capacidade das cavidades obtidas no MIP desenvolvido interagirem diretamente com a molécula do analito, como demonstrado na Tabela 2. Esse parâmetro apresenta um maior valor para o ácido láctico quando comparado com os valores obtidos para as moléculas estudadas como interferentes, confirmando que as cavidades impressas obtidas apresentam boa seletividade para o analito, fato confirmado pela análise dos valores obtidos para o fator β [43].

Tabela 2- Parâmetros de seletividade para o GCE-RGO-AuNPS-MIP e GCE-RGO-AuNPs-NIP

Molécula	MIP (μA)	NIP (μA)	α	β
Ácido láctico	31,0	4,1	7,5	1,0
Ácido málico	7,6	5,7	1,3	5,7
Ácido tartárico	8,1	5,9	1,3	5,5
Ácido butírico	5,5	4,5	1,2	6,2
Ácido acético	8,1	5,4	1,4	5,3
Glicose	8,7	5,3	1,6	4,6
Glicerol	7,7	6,8	1,1	6,7

4.1.8 Determinação de ácido láctico em vinhaça de cana de açúcar

Para a determinação de ácido láctico em vinhaça de cana de açúcar algumas alíquotas da amostra foram diluídas, para alcançar uma faixa de concentração compatível com o sensor desenvolvido.

A determinação de ácido láctico nesta amostra complexa foi realizada utilizando o método de adição de padrão, o qual resumidamente consiste em adicionar quantidades conhecidas do analito num volume conhecido da amostra.

As amostras de vinhaça enriquecidas com concentrações conhecidas de ácido láctico foram utilizadas para a obtenção de voltamogramas utilizando a técnica de DPV, os quais permitiram a construção de uma curva de adição de padrão relacionando a concentração da espécie de interesse adicionada à amostra com as respectivas respostas obtidas.

O ponto que curva analítica encontra o eixo das ordenadas corresponde à resposta em corrente para a espécie analisada sem qualquer adição de padrão, nesse contexto a extrapolação da curva no eixo das abscissas corresponde à concentração real da espécie de interesse na amostra analisada.

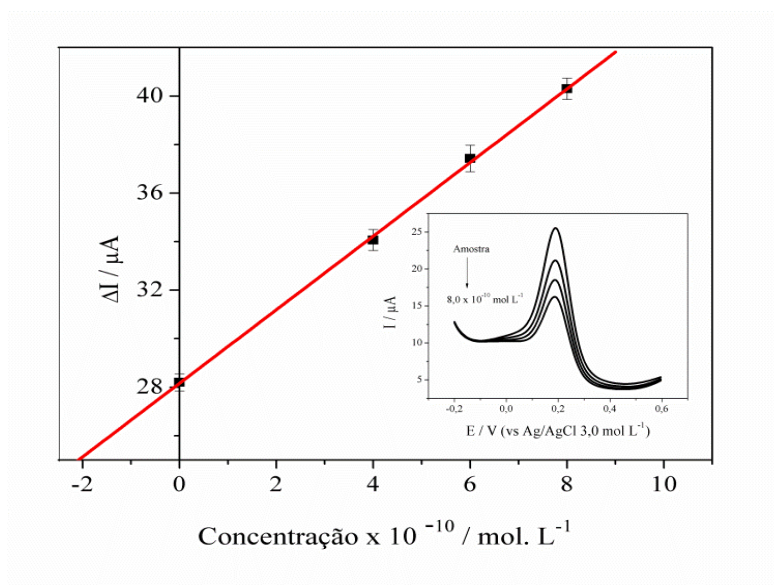
A Figura 25 apresenta a curva analítica obtida após a adição de padrão com concentrações conhecidas de ácido láctico ($4,0$; $6,0$ e $8,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) em amostras de vinhaça de cana de açúcar.

Analisando a Figura 25 é possível observar que a corrente do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP varia linearmente com as concentrações de ácido láctico adicionadas à amostra de vinhaça de cana de açúcar, de acordo com a seguinte equação de regressão linear: $\Delta I = 1,27 \times 10^4 \text{ C (ácido láctico)} + 2,96 \times 10^{-4}$ ($r = 0,9997$).

A inserção da Figura 25 mostra as respostas obtidas em corrente com a técnica de DPV após o processo de religação para cada adição de ácido láctico realizada na amostra de vinhaça de cana de açúcar.

A concentração de ácido láctico determinada com sensor desenvolvido GCE-RGO-AuNPs-MIP nas amostras de vinhaça de cana de açúcar estudadas foi de $2,32 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \pm 5,14 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 25- Curva de adição de padrão para a determinação de ácido láctico em amostras de vinhaça de cana de açúcar.



Fonte: elaborado pelo autor

4.1.9 Validação do método analítico desenvolvido

A etapa de validação é de fundamental importância para confirmar a adequação da metodologia desenvolvida na determinação do analito de interesse, nesse contexto o ensaio de recuperação é o procedimento mais utilizado para a validação de metodologias analíticas.

Os ensaios de recuperação estão associados à exatidão do método, pois relacionam a quantidade recuperada do analito com a quantidade real presente na amostra. A exatidão do método é expressa em termos de erro sistemático percentual, característicos de todos os processos analíticos, que pode ocorrer pela perda da substância ocasionada pela baixa recuperação da extração, medidas imprecisas, algumas substâncias interferentes, entre outras causas.

Os ensaios de recuperação foram realizados através da chamada fortificação da amostra, com a adição de diferentes concentrações de ácido láctico na vinhaça de cana de açúcar, após cada adição realizou-se a determinação da concentração de ácido láctico na amostra, sendo calculado o valor recuperado.

A Tabela 3 mostra os valores adicionados e recuperados no estudo, além da porcentagem de recuperação, do desvio padrão para as medias obtidas e os valores de t calculados.

Tabela 3- Estudos de recuperação para o ácido láctico em amostras de vinhaça de cana de açúcar.

Amostra	Quantidade adicionada (10^{-10} mol L ⁻¹)	Quantidade detectada (10^{-10} mol L ⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)	t calculado**
Vinhaça de cana-de-açúcar*	4,0	3,9 ± 0,2	97,7	3,8	-1,03
	6,0	6,3 ± 0,3	105,1	2,1	4,21
	8,0	8,2 ± 0,2	102,1	4,9	1,73

*Quantidade de ácido láctico detectada na amostra de vinhaça = $2,32 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ ± $5,14 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹

** t tabelado = 4,3 para um nível de 95%

Como observado na Tabela 3 os valores para as recuperações médias variaram de 97,75 % a 105, 1% com valores de RSD entre 2,10 % e 4,91%, esses resultados indicam que o método desenvolvido apresenta boa exatidão para a determinação de ácido láctico em amostras de vinhaça de cana de açúcar e que a resposta do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP não sofre efeitos significativos da matriz estudada.

As concentrações encontradas foram ainda comparadas estatisticamente com as concentrações adicionadas aplicando o chamado teste t de Student não pareado, os resultados foram obtidos para um nível de confiança de 95%.

Como observado na Tabela 3 os valores para $t_{\text{calculado}}$ foram inferiores em comparação com valores de t_{tabelado} , indicando, portanto, que o sensor desenvolvido pode ser aplicado com sucesso para a determinação de ácido láctico em vinhaça de cana de açúcar.

4.1.10 Conclusões parciais

Neste trabalho um sensor eletroquímico baseado em MIP foi desenvolvido para a determinação de ácido láctico em vinhaça de cana de açúcar, o MIP foi obtido através da eletropolimerização do monômero o-PD na superfície do eletrodo de carbono vítreo modificada com RGO e AuNPs.

Os resultados obtidos utilizando as técnicas de VC, EIE, MEV e AFM permitiram confirmar que as modificações realizadas na superfície do eletrodo, inicialmente com RGO e AuNPs e depois com MIP, foram alcançadas com sucesso, sendo possível comprovar a formação do filme polimérico sobre a superfície modificada.

As otimizações dos parâmetros experimentais para a construção do MIP sobre a superfície modificada do eletrodo GCE-RGO-AuNPs permitiram alcançar um desempenho analítico superior para o sensor, melhorando sua sensibilidade, seletividade e limites de detecção e quantificação.

As duas faixas lineares de concentração obtidas para o ácido láctico foram estudadas em termos da isoterma de Langmuir, permitindo confirmar, por meio do valor calculado para K_d , uma boa afinidade para o ácido láctico nas cavidades do MIP.

A resposta do sensor GCE-RGO-AuNPs-MIP para moléculas com estruturas e grupos funcionais semelhantes ao ácido láctico presentes na vinhaça e que podem se comportar como interferentes na determinação demonstrou que os sítios de reconhecimento obtidos no MIP apresentam boa seletividade para o ácido láctico.

O sensor desenvolvido foi aplicado com sucesso na determinação de ácido láctico em amostras de vinhaça de cana de açúcar, com recuperações médias variando de 97,7% a

105,1% com RDS variando de 2,10% a 4,91%, indicando que método desenvolvido apresenta boa exatidão para a determinação de ácido láctico e não sofre efeito de matriz.

Dessa maneira os resultados obtidos indicam que o sensor desenvolvido baseado em MIP obtido pela polimerização do monômero o-PD sobre uma superfície modifica com RGO e AuNPs pode ser aplicado pra a determinação de ácido láctico em amostras de vinhaça de cana de açúcar, permitindo assim quantificar esse importante ácido neste resíduo.

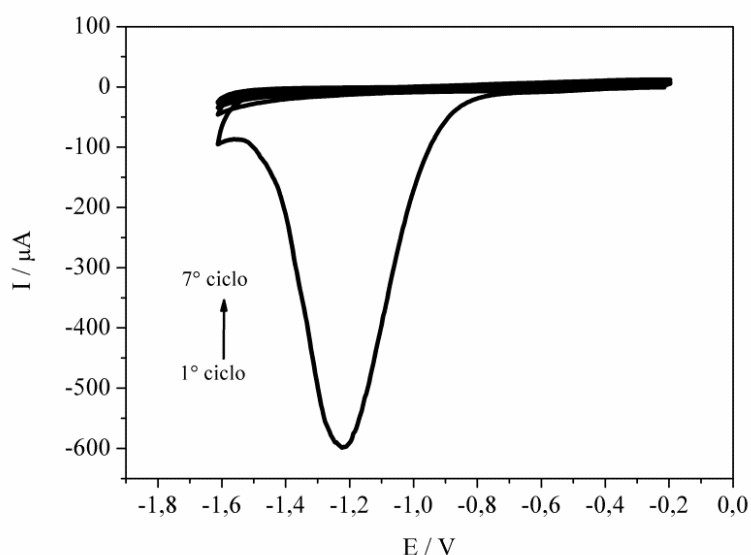
4.2 Sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP

4.2.1 Preparação do sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP

4.2.1.1 Eletrodeposição Óxido de Grafeno Reduzido

Materiais à base de grafeno têm demonstrado habilidade para promover reações de transferência eletrônica, facilitando o processo na superfície de eletrodos. A modificação do eletrodo com óxido de grafeno reduzido (RGO) foi realizada utilizando a técnica de voltametria cíclica, aplicando ciclos sucessivos no intervalo de potencial de -1,60 a -0,20 V, numa velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , os voltamogramas cíclicos obtidos são mostrados a seguir na Figura 26.

Figura 26- Voltamogramas cíclicos para a modificação do eletrodo de GCE com RGO num intervalo de potenciais de -1,60 V a -0,20 V em solução desaeada de Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: elaborado pelo autor

Para a modificação do eletrodo GCE com RGO, inicialmente foi pingado uma alíquota de $1,0 \mu\text{L}$ da suspensão do óxido de grafeno numa concentração de 2 mg. mL^{-1} na superfície do eletrodo de GCE, após a realização da secagem do eletrodo à temperatura ambiente o mesmo foi levado a uma célula eletroquímica em meio de Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para a realização do processo de eletroredução das nanofolhas de grafeno.

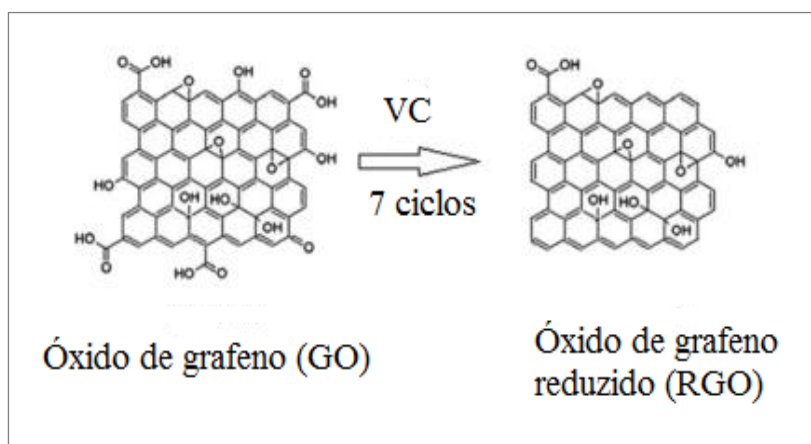
Como pode ser observado na Figura 26, é possível identificar um pico catódico irreversível em aproximadamente -1,25 V, o qual corresponde ao processo de redução de alguns grupos oxigenados presentes nas folhas do óxido de grafeno, sendo formado o óxido

de grafeno reduzido (RGO). Após poucos ciclos não é mais possível observar o pico catódico, fato que sugere uma redução quase completa dos grupos oxigenados inicialmente presentes.

O esquema da Figura 27 ilustra o possível processo eletródico que ocorre na superfície do eletrodo de carbono vítreo para a redução do óxido de grafeno e formação do RGO com os sucessivos ciclos voltamétricos aplicados.

Os melhores resultados em resposta de corrente para a sonda eletroquímica com o eletrodo modificado foram obtidos após a aplicação de 7 ciclos voltamétricos consecutivos para a redução do óxido de grafeno na superfície do GCE, nas condições experimentais descritas anteriormente.

Figura 27- Ilustração do processo de redução do óxido de grafeno para óxido de grafeno reduzido (RGO) na superfície do eletrodo GCE após sucessivos ciclos voltamétricos.



Fonte: elaborado pelo autor

4.2.1.2 Eletrodeposição CuNPs

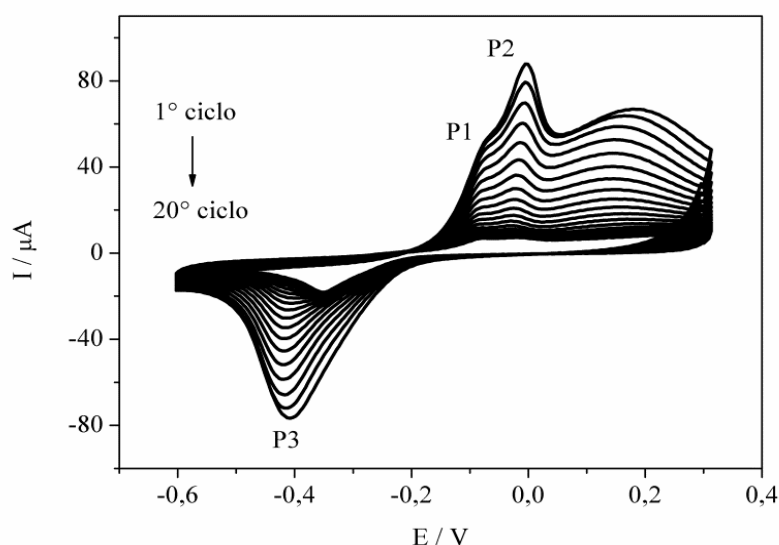
Após o estudo para a escolha das melhores condições de eletrodeposição para o RGO na superfície do eletrodo GCE foi realizado o estudo para a eletrodeposição das nanopartículas de cobre na superfície do eletrodo modificado com RGO.

Para tal foi utilizada a técnica de cronoamperometria, aplicando um potencial de -0,4 V até o acúmulo de 5,0 mC de carga na superfície do eletrodo, utilizando uma solução $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de CuSO₄ em meio Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ desaerado. Nessas condições foram obtidas as melhores respostas em corrente para a sonda.

Nesta etapa também foi realizado o estudo para a seleção das melhores condições para o processo de formação do óxido de cobre na superfície do eletrodo modificado com RGO por meio da oxidação do cobre metálico eletrodepositado na etapa anterior. A formação do óxido de cobre foi realizada em meio alcalino também desaerado, para tal foi utilizada uma solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹.

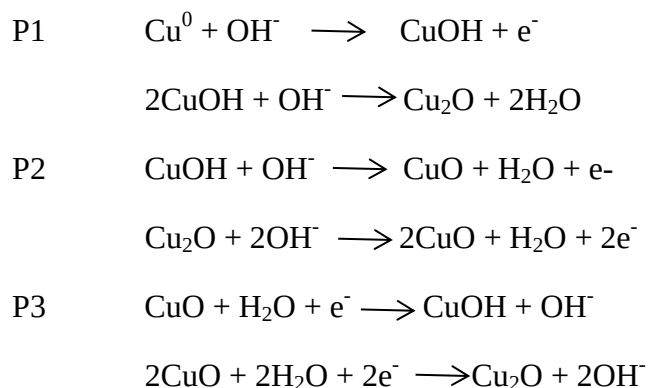
Foram aplicados sucessivos ciclos utilizando a técnica de voltametria cíclica no intervalo de -0,60 V a 0,30 V numa velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 28. Os melhores resultados em corrente para a oxidação da sonda foram obtidos aplicando 20 ciclos sucessivos para a oxidação do cobre metálico na superfície do eletrodo modificado com RGO.

Figura 28- Voltamogramas cíclicos para a oxidação das nanopartículas de cobre na superfície do eletrodo GCE-RGO em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.



Fonte: elaborado pelo autor

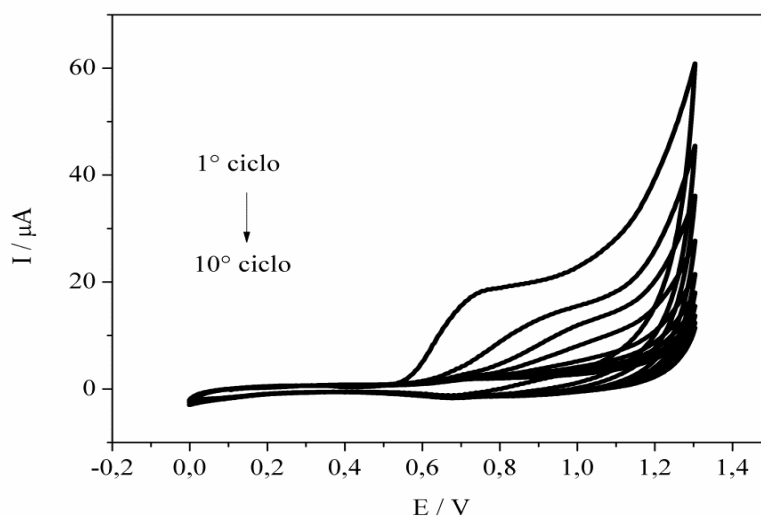
Ao analisar a Figura 28, é possível observar a presença dos picos característicos para a oxidação/redução do cobre em meio alcalino, representados por P1, P2 e P3, a seguir as equações descrevem as reações envolvidas[83].



4.2.1.3 Eletropolimerização do monômero IAA

A eletropolimerização do monômero ácido indol ácido (IAA) para a obtenção do MIP sobre a superfície modificada do eletrodo (GCE-RGO-CuNPs) foi realizada em meio de tampão PBS 0,10 mol L⁻¹ (pH 6,0) na presença de ácido málico utilizando a técnica de voltametria cíclica, aplicando sucessivos ciclos num intervalo de potencial de 0,0 a 1,3 V vs. Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹), numa velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. A Figura 29 mostra os voltamogramas obtidos para esta etapa.

Figura 29- Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização do monômero IAA 6,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ no eletrodo modificado GCE-RGO-CuNPs na presença de ácido málico 2,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em tampão PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 6,0.



Fonte: elaborado pelo autor

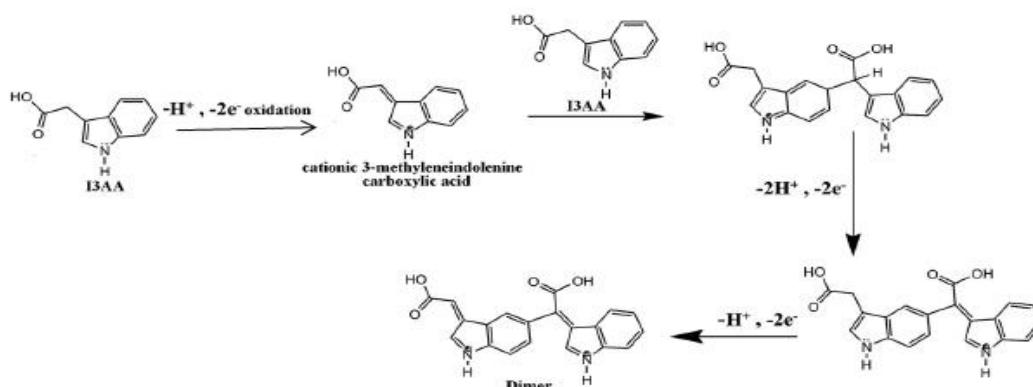
Ao analisar a Figura 29 é possível observar a presença de um pico anódico irreversível em aproximadamente 0,70 V vs Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) o qual corresponde à eletrooxidação do monômero IAA na superfície do eletrodo modificado (GCE-RGO-CuNPs) para a formação do cátion carboxílico 3-metileneindolino, a qual envolve $2e^-$ e $2H^+$, o cátion formado desencadeia a reação de polimerização para o crescimento da cadeia polimérica na superfície do eletrodo e formação do MIP.

Ainda analisando a Figura 29 é possível observar que a intensidade das correntes de pico diminui progressivamente com o aumento do número de ciclos voltamétricos, assim como observado para a o-PD, esse comportamento é característico na polimerização desse monômero e indica a formação de um filme compacto e pouco condutor na superfície do eletrodo [70].

O mecanismo descrito na literatura para a reação de polimerização desse monômero na superfície do eletrodo é mostrado a seguir na Figura 30, onde é possível observar na primeira etapa o processo oxidativo responsável por formar o cátion que desencadeia (formando inicialmente um dímero) e mantém a reação de polimerização [69].

A reação de polimerização prossegue por meio da inserção de outros cátions radicais, obtidos na primeira etapa de oxidação, ao dímero formado permitindo assim o crescimento da cadeia na superfície do eletrodo, assim é muito importante promover adequadamente a reação de oxidação do monômero na superfície do eletrodo selecionando as melhores condições experimentais.

Figura 30 - Mecanismo para a eletropolimerização do monômero IAA.



Nesta etapa também foi preparado um sensor não impresso (GCE-RGO-CuNPs-NIP), onde realizou-se o processo de polimerização na superfície do eletrodo modificado nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente para o sensor impresso (GCE-RGO-CuNPs-MIP), exceto pela presença da molécula molde (ácido málico).

Tal procedimento é realizado com a finalidade de confirmar o sucesso da etapa de impressão molecular e verificar se a molécula molde interfere de alguma maneira no processo de eletropolimerização na superfície do eletrodo.

Durante o preparo do sensor não impresso não foi observada nenhuma diferença significativa entre os voltamogramas cíclicos obtidos na presença de ácido málico (GCE-RGO-CuNPs-MIP) e na ausência (GCE-RGO-CuNPs-NIP), sendo possível identificar a presença do pico anódico na mesma região de potencial e a mesma diminuição nas intensidades das correntes de pico com o aumento do número de ciclos.

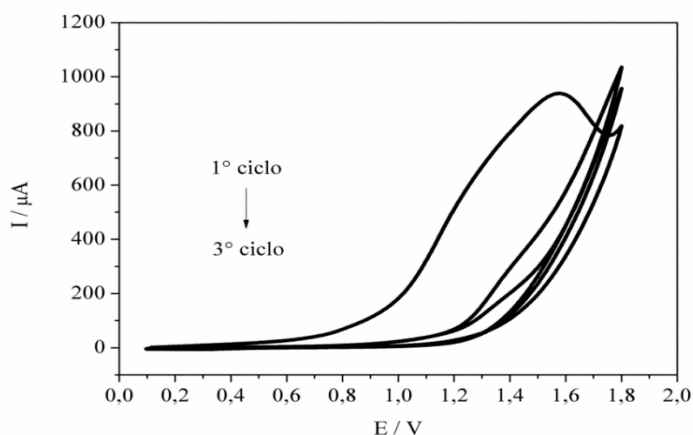
Tal comportamento confirma que a molécula molde de ácido málico não apresenta eletroatividade na faixa de potencial aplicada para a eletropolimerização do monômero, dessa maneira sua estrutura permanece inalterada durante todo o processo de construção do MIP, o que permite a obtenção de cavidades seletivas após a etapa de remoção para seu posterior reconhecimento na etapa de religação.

Após a formação do MIP na superfície do eletrodo GCE-RGO-CuNPs a molécula molde (ácido málico) foi removida da matriz polimérica obtida, utilizando para tal o chamado processo de superoxidação (do inglês: “overoxidation”).

Tal processo consiste em submeter o polímero obtido na superfície do eletrodo a elevados potenciais (acima dos valores aplicados na eletropolimerização), essa condição permite remover as cargas negativas do polímero, liberando assim a molécula molde e permitindo a obtenção da cavidade seletiva no polímero para um posterior reconhecimento.

Os voltamogramas cíclicos obtidos estão apresentados na Figura 31, onde é possível observar a presença de um pico anódico irreversível em aproximadamente + 1,60 V vs Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹), o qual corresponde à oxidação dos grupos -NH no interior do polímero, permitindo assim a saída da molécula molde.

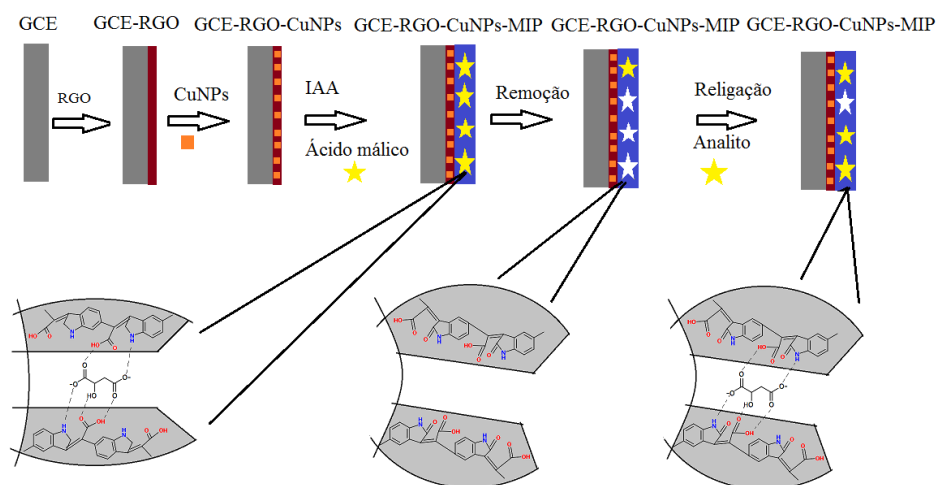
Figura 31- Voltamogramas para a remoção da molécula molde da matriz polimérica de IAA, obtidos em meio de NaOH 0,10 mol L⁻¹ numa velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.



Fonte: elaborado pelo autor

Um possível processo de impressão molecular para o ácido málico (pK_{a1}=3,4 e pK_{a2}=5,4) na matriz polimérica obtida com o monômero IAA é descrito na Figura 32, na qual pode ser destacada a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo hidroxila não dissociado, os grupos carboxila do ácido málico com os grupos N-H e COOH presentes nas cavidades seletivas do polímero. Sendo essas interações as principais responsáveis pelo processo de religação do ácido málico, permitindo assim o reconhecimento desse ácido numa amostra complexa como é o caso da vinhaça de cana de açúcar.

Figura 32- Esquema de impressão molecular para o ácido málico



Fonte: elaborado pelo autor

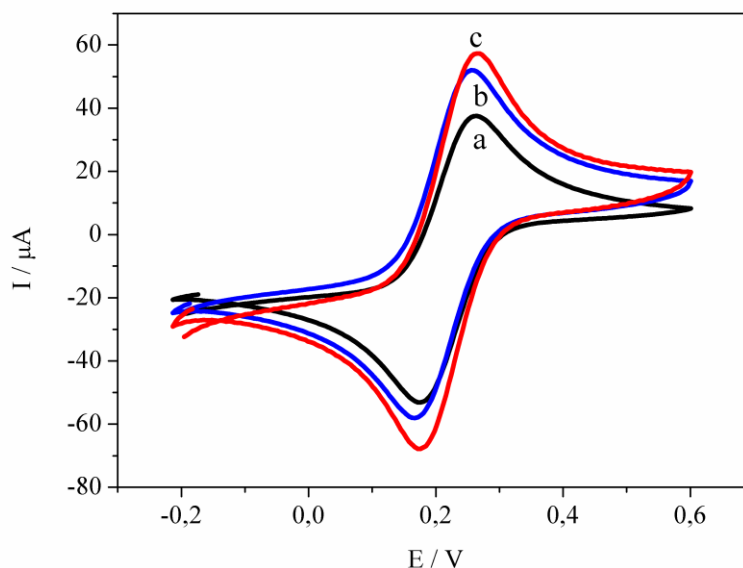
4.2.2 Caracterização do eletrodo GCE-RGO-CuNPs-MIP

4.2.2.1 Caracterização eletroquímica

As etapas de modificação do eletrodo com óxido de grafeno reduzido (RGO) e nanopartículas de óxido de cobre (CuNPs), antes da eletropolimerização do monômero IAA para a construção do MIP, foram caracterizadas eletroquimicamente utilizando as técnicas de VC e EIE.

Na Figura 33 são apresentados os resultados obtidos com a técnica de VC para as etapas de modificação do eletrodo de carbono vítreo (GCE), primeiro com RGO e em seguida com (CuNPs), foi utilizado o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ numa concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para a obtenção da resposta eletroquímica.

Figura 33- Voltamogramas cíclicos numa velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} para: (a) GCE, (b) GCE-RGO e (c) GCE-RGO-CuNPs, utilizando uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ numa concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: elaborado pelo autor

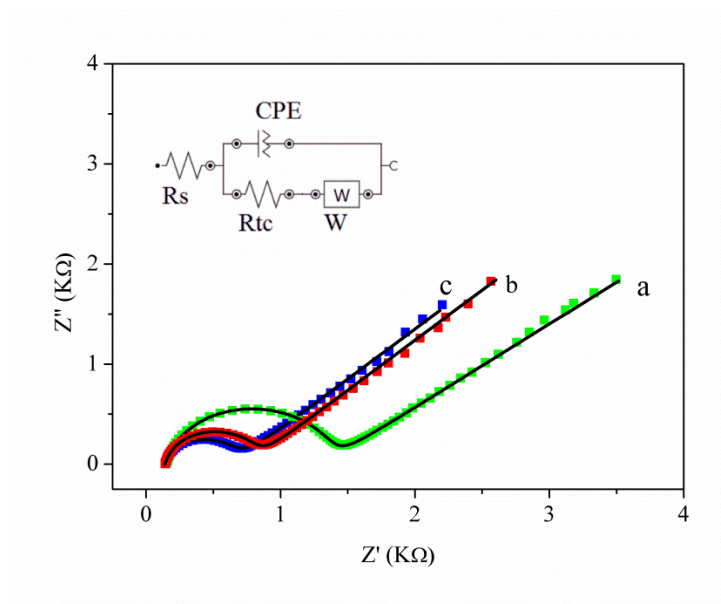
Analisando a Figura 33 é possível observar um aumento expressivo para as correntes de pico anódico e catódico quando comparamos o eletrodo não modificado GCE (curva a), com o eletrodo modificado inicialmente com RGO (curva b) e posteriormente com RGO e CuNPs (curva c).

Esse aumento marcante de corrente tem relação com aumento da condutividade e da área superficial do eletrodo, proporcionado pela presença das CuNPs eletrodepositadas sobre a superfície de RGO, o que facilita o processo de transferência eletrônica para a sonda, proporcionando assim ao eletrodo modificado uma maior resposta, o que pode proporcionar uma maior sensibilidade para o sensor desenvolvido.

A caracterização eletroquímica para as etapas de modificação do eletrodo também foi realizada utilizando a técnica EIE, a qual permite identificar os componentes da interface eletrodo-solução que podem influenciar no processo de transferência eletrônica para a sonda na superfície modificada do eletrodo.

Na Figura 34 são apresentados gráficos de Nyquist obtidos nos estudos de EIE para o eletrodo não modificado GCE (curva a), para o eletrodo modificado com RGO (curva b) e para o eletrodo modificado com RGO e CuNPs (curva c).

Figura 34- Gráficos de Nyquist para: (a) GCE, (b) GCE-RGO e (c) GCE-RGO-CuNPs, numa solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, para um intervalo de frequência de 10×10^5 a $5,0 \times 10^{-3} \text{ Hz}$, com uma amplitude “rms” de 10 mV. Figura interna: ajuste do circuito elétrico equivalente para os resultados obtidos.



Fonte: elaborado pelo autor

Inicialmente os resultados foram analisados em termos da chamada resistência de transferência de carga (R_{tc}), a qual pode determinar o valor numérico da resistência de

transferência eletrônica para a interface eletrodo-solução, no gráfico é identificada como o segundo intercepto no eixo da impedância real (Z').

Analisando a Figura 34, é possível observar que os valores de R_{tc} diminuem progressivamente quando comparamos o eletrodo não modificado GCE ($R_{tc} = 1400 \, \Omega$, curva a) com o eletrodo modificado inicialmente com RGO ($R_{tc}=890 \, \Omega$, curva b) e posteriormente com RGO-CuNPs ($R_{tc}=703 \, \Omega$, curva c), confirmando que as modificações realizadas na superfície do eletrodo facilitam o processo de transferência eletrônica para a sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$.

Os resultados obtidos também foram interpretados em termos de circuito elétrico equivalente o qual permite relacionar os componentes da interface com componentes físicos de um circuito elétrico comum.

O circuito elétrico equivalente que melhor representou os dados experimentais obtidos é apresentado na inserção da Figura 34, o qual é formado por uma resistência (R_s), relacionada com a resistência da solução, conectada em serie com um arranjo formado por um elemento de fase constante (CPE), relacionado com a capacitância da dupla camada, conectado em paralelo com R_{tc} , a qual estar conectada em serie com a chamada impedância de Warburg, o que sugere controle difusional para o processo de transferência eletrônica da sonda na superfície modificada do eletrodo RGO-CuNPs.

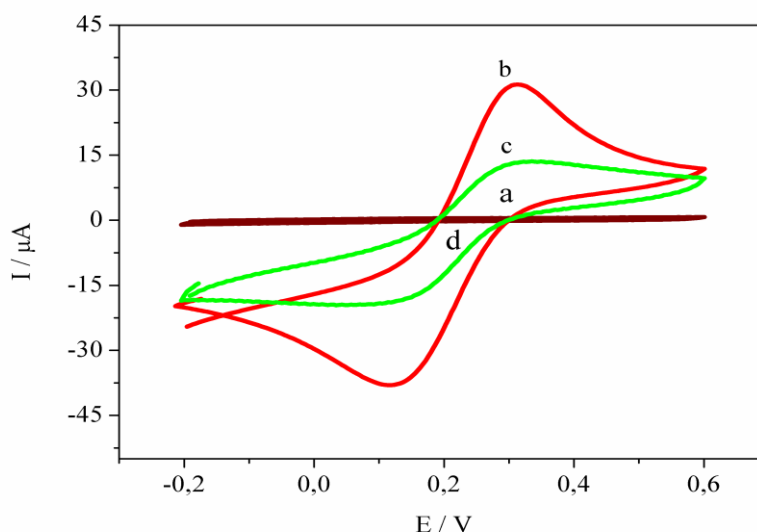
Após a modificação inicial do eletrodo (GCE-RGO-CuNPs) foi realizado o processo de eletropolimerização do monômero IAA na presença do ácido málico na superfície do eletrodo (Figura 29) para o preparo do MIP, onde cada uma das etapas de construção do MIP também foram caracterizadas eletroquimicamente com as técnicas VC e EIE.

Na Figura 35 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos como resposta para a sonda eletroquímica em cada uma dessas etapas para a construção do MIP na superfície do eletrodo.

Analisando a Figura 35 é possível observar que após a eletropolimerização do monômero IAA na presença de ácido málico para a obtenção do GCE-RGO-CuNPs-MIP (curva a) e na ausência de ácido málico para a obtenção do GCE-RGO-CuNPs-NIP, (curva d) não é possível identificar a presença dos picos característicos para o par redox da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$, o que confirma a presença de um filme polimérico compacto e pouco condutor

recobrando toda a superfície do eletrodo modificado, o que impede o processo de transferência eletrônica para a sonda.

Figura 35- Voltamogramas cíclicos numa velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} para: (a) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a polimerização, (b) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a remoção da molécula molde, (c) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a religação do ácido málico e (d) GCE-RGO-CuNPs-NIP.



Fonte: elaborado pelo autor

Ainda analisando a Figura 35, após a remoção da molécula molde (ácido málico) da matriz polimérica é possível observar claramente a presença dos picos redox característicos para a sonda (curva b), esse comportamento indica que o processo de remoção (“overoxidation”) permitiu a extração das moléculas de ácido málico da matriz polimérica de IAA, possibilitando assim a formação de cavidades que permitem a chegada a sonda até a superfície modificada do eletrodo para o processo de transferência eletrônica.

O processo de religação foi realizado utilizando uma solução de ácido málico numa concentração de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, após um tempo de contato de 15 minutos do eletrodo com esta solução, sob agitação branda, é possível observar uma diminuição nas intensidades de corrente de pico para a sonda, mostrada na curva c da Figura 35.

Essa diminuição clara na intensidade das correntes indica que algumas cavidades impressas obtidas na etapa de remoção foram ocupadas com sucesso por moléculas do ácido málico num processo de religação, o que acaba dificultando a chegada da sonda até a

superfície modificada do eletrodo para a ocorrência do processo de transferência eletrônica, confirmando assim o sucesso nas etapas de remoção e religação para o ácido málico.

As etapas de construção do MIP na superfície do eletrodo também foram caracterizadas utilizando a técnica EIE, da mesma maneira como nas etapas de modificação do eletrodo com RGO e CuNPs, inicialmente foi utilizado o parâmetro R_{tc} para estudar cada etapa da construção do MIP. A Figura 36 mostra os resultados obtidos na forma de gráficos de Nyquist para cada uma destas etapas.

Analisando a Figura 36 (curva a) é possível observar que após a processo de eletropolimerização do monômero IAA sobre a superfície modificada do eletrodo o valor de R_{tc} é de aproximadamente 60,5 k Ω , confirmando que foi obtido um filme compacto e pouco condutor que recobre toda a superfície do eletrodo, o qual dificulta o processo de transferência eletrônica para a sonda.

Após a etapa de remoção “overoxidation” a Figura 36 (curva b) demonstra que o valor de R_{tc} diminui significativamente, $R_{tc}=5,9$ k Ω , confirmando a saída da molécula molde da matriz polimérica e formação das cavidades seletivas de reconhecimento, o que permite a chegada da sonda até a superfície do eletrodo.

Em seguida o processo de religação foi realizado com uma solução de ácido málico numa concentração de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, após 15 minutos de contato do eletrodo com a solução sob agitação branda.

Após esta etapa o gráfico de Nyquist obtido, Figura 36 curva c, mostra um aumento no valor de $R_{tc}=35,7$ k Ω para o eletrodo, confirmando que algumas cavidades formadas na etapa de remoção foram ocupadas por moléculas de ácido málico, o que dificulta a chegada da sonda até a superfície do eletrodo.

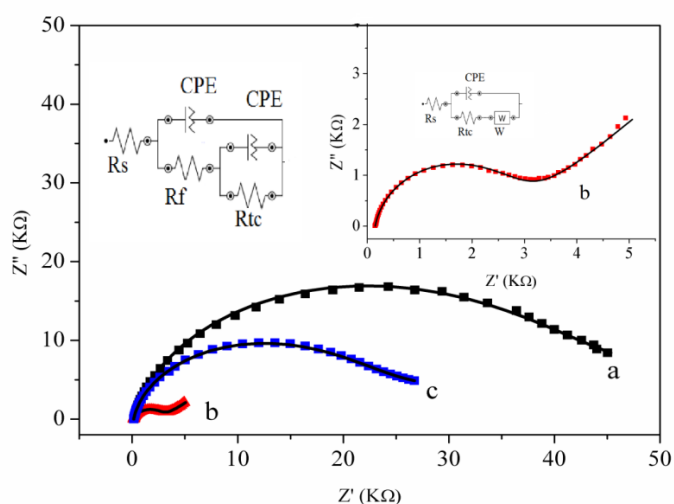
Um fato interessante a ser destacado é o perfil do gráfico Nyquist obtido para a etapa de remoção (curva b), onde é possível observar um perfil diferente quando comparado com gráficos obtidos para as outras duas etapas na construção do MIP, indicando que após a remoção a resposta para a sonda na superfície do sensor pode apresentar características diferentes.

Os resultados obtidos nessa etapa de construção do sensor também foram estudados em termos do chamado circuito elétrico equivalente, o qual permite caracterizar os diferentes

componentes da interface eletrodo-solução que podem influenciar no processo de transferência eletrônica.

O circuito obtido para as etapas de eletropolimerização e religação é demonstrado na inserção superior esquerda da Figura 36, é formado por uma resistência R_s , relacionada com a resistência da solução, a qual está conectada em série com um CPE, elemento de fase constante, relacionada com a capacitância da dupla camada, conectado em paralelo com uma resistência de transferência de carga R_{tc} . Este arranjo está conectado com um segundo arranjo, formado por uma segunda resistência e um segundo CPE, os quais são relacionados com o filme polimérico obtido na superfície do eletrodo.

Figura 36 - Gráficos de Nyquist para: (a) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a polimerização, (b) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a remoção da molécula molde, (c) GCE-RGO-CuNPs-MIP após a religação das moléculas de ácido málico, numa solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, para um intervalo de frequência de $1,0 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ Hz}$, com uma amplitude “rms” de 10 mV. Figura interna: Circuito elétrico equivalente para os resultados obtidos nas etapas de polimerização do monômero IAA e remoção (curvas a e c), gráfico de Nyquist ampliado para a resposta do sensor após a etapa de remoção (curva b) com seu circuito elétrico equivalente.



Fonte: elaborado pelo autor

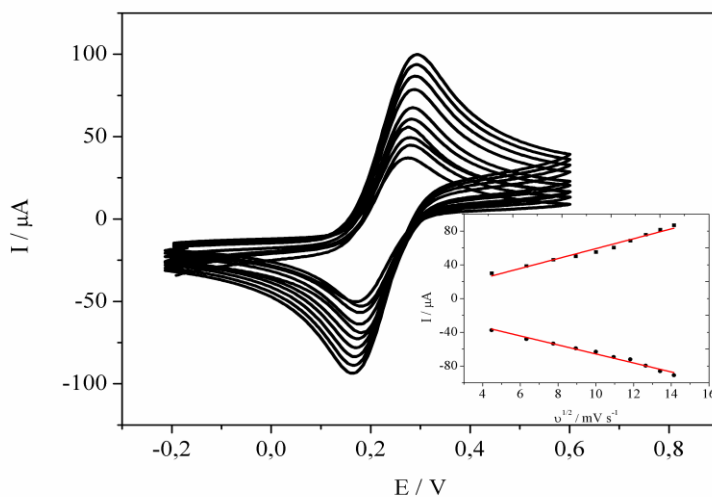
O circuito elétrico obtido para etapa de remoção sugere uma mudança de comportamento para o eletrodo após esta etapa, o circuito obtido é formado por uma resistência, relacionada com a resistência da solução (R_s), conectada em série com um elemento de fase constante (CPE) conectado em paralelo com uma resistência de transferência

de carga (R_{tc}), a qual está conectada em série com um elemento de Warburg, indicando que após a remoção da molécula molde o processo eletródico para a sonda na superfície modificada do eletrodo é controlado por difusão.

Como ultima caracterização eletroquímica para o sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP a técnica de VC foi utilizada para investigar a natureza dos processos eletródicos que ocorrem na superfície do eletrodo GCE-RGO-CuNPs para a sonda após a remoção da molécula molde, para tal foram realizados estudos sobre o efeito da velocidade de varredura sobre a intensidade das correntes de pico para a sonda após a remoção da molécula molde.

Como pode ser observado a seguir na Figura 37, a intensidade para as correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) aumentam com o aumento da velocidade de varredura no intervalo de 20 a 200 mV s^{-1} , de maneira que os valores de I_{pa} e I_{pc} variam linearmente com a raiz quadrada das velocidades de varredura aplicadas, inserção da Figura 37.

Figura 37- Voltamogramas cíclicos para o sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP após a remoção da molécula molde utilizando uma solução de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura. Inserção: relação entre as correntes de pico anódica e catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura.



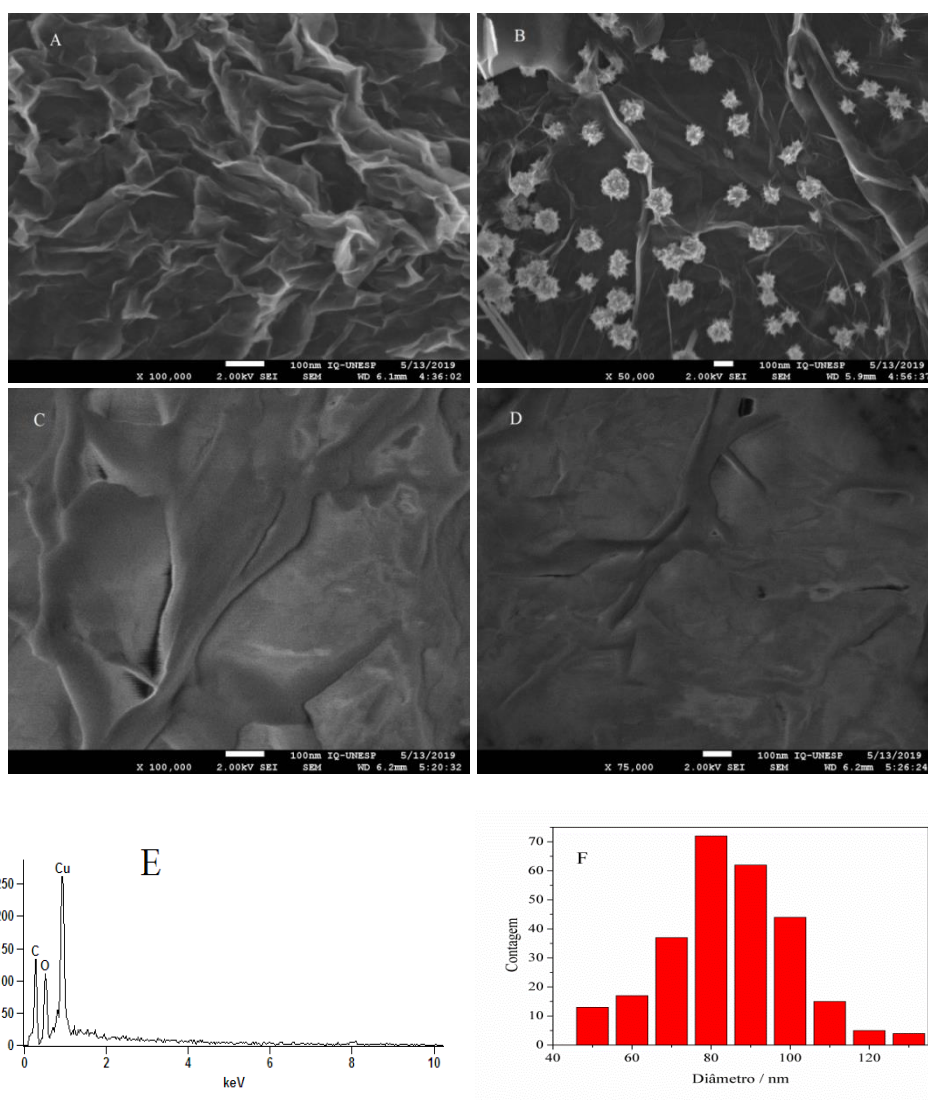
Fonte: elaborado pelo autor

A relação matemática para tal pode ser expressa como: $I_{pa} = 5,51 \times 10^{-7} v^{1/2} + 5,86 \times 10^{-6}$ ($r=0,997$) e $I_{pc} = -4,22 \times 10^{-6} v^{1/2} - 6,33 \times 10^{-6}$ ($r=0,998$), esse comportamento indica que o sensor eletroquímico desenvolvido (GCE-RGO-CuNPs-MIP) apresenta um processo eletródico para a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ controlado por difusão, o que confirma os resultados obtidos preliminarmente utilizando a técnica EIE, apresentados anteriormente.

4.2.2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica do sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP foi realizada utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG), os resultados obtidos estão apresentados na Figura 38.

Figura 38- Imagens MEV-FEG para: (A) GCE-RGO, (B) GCE-RGO-CuNPs, (C) GCE-RGO-CuNPs-MIP, (D) GCE-RGO-CuNPs-NIP (E) Espectro EDX para GCE-RGO-CuNPs e (F) variação do diâmetro médio das nanopartículas.



Fonte: elaborado pelo autor

A Figura 38A apresenta as imagens MEV-FEG obtidas para o eletrodo modificado com RGO (GCE-RGO) demonstrando o aspecto “enrugado ou de folha de papel amassada” característico para as nanofolhas de grafeno eletrodepositadas na superfície do eletrodo de GCE, essa organização espacial característica é responsável pelo aumento da área superficial

do eletrodo oferecida pelo RGO, o que reflete num aumento da resposta do eletrodo para a sonda eletroquímica.

A Figura 38B mostra os resultados para GCE-RGO-CuNPs, sendo possível observar claramente a formação das nanopartículas de óxido de cobre na superfície do eletrodo modificado GEC-RGO sobre as nanofolhas de grafeno, as quais apresentaram um diâmetro médio de 80,0 nm Figura 38F. O espectro de EDX apresentado na Figura 38E confirma a presença de cobre na superfície do eletrodo.

As imagens MEV-FEG obtidas após a polimerização do monômero IAA, na presença de ácido málico, para a obtenção GCE-RGO-CuNPs-MIP são apresentadas na Figura 38C e na ausência de ácido málico, para a obtenção do GCE-RGO-AuNPs-NIP na Figura 38D, sendo possível observar claramente a formação da matriz polimérica, a qual recobre a superfície modificada do eletrodo em ambos os casos.

4.2.3 Estudo e otimização dos parâmetros que influenciam o desempenho do MIP

Para o presente trabalho foram estudados os seguintes parâmetros para a construção do MIP: pH e número de ciclos voltamétricos para a eletropolimerização do monômero IAA, razão entre as concentrações molares do monômero e da molécula molde (ácido málico), número de ciclos voltamétricos para a remoção da molécula molde e tempo de religação para o analito.

Todos esses parâmetros podem interferir na espessura do filme polimérico obtido na superfície do eletrodo, na sua estabilidade química e física, na distribuição dos sítios seletivos de reconhecimento e na sua uniformidade, os quais têm influência direta no desempenho analítico do sensor.

Nesta etapa de otimização das condições experimentais para a construção do MIP foi utilizada a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) para a obtenção do sinal analítico a partir da oxidação da sonda eletroquímica.

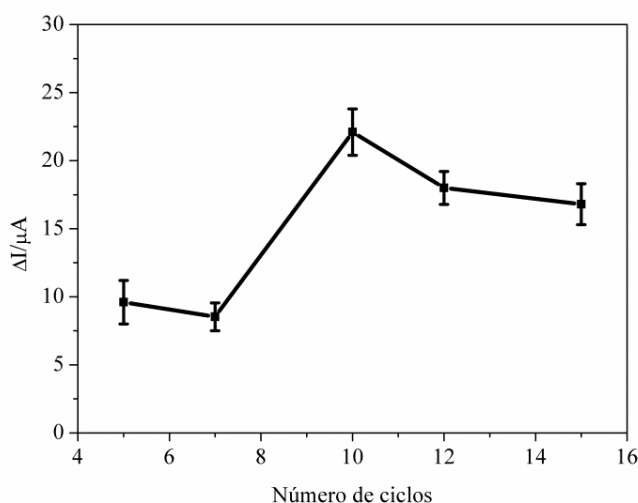
O sinal analítico calculado é baseado na chamada variação de corrente de pico (ΔI), a qual obtida pela diferença entre a corrente de pico medida para a oxidação da sonda logo após a remoção da molécula molde (I_{rem}) e a corrente de pico mediada para a oxidação da sonda após a religação da molécula molde (I_{rel}) nas cavidades seletivas do MIP, conforme Equação 1.

4.2.3.1 Efeito do número de ciclos voltamétricos para a eletropolimerização

A sensibilidade e a estabilidade do sensor são diretamente afetadas pelo número de ciclos voltamétricos aplicados para a eletropolimerização, assim esta é uma das etapas de otimização mais importantes para a construção de um MIP, nesse trabalho foram estudados 5, 7, 10, 12 e 15 ciclos voltamétricos para a eletropolimerização do monômero IAA na presença de ácido málico na superfície modificada do eletrodo.

Os resultados obtidos na forma de variação de corrente estão apresentados na Figura 39, onde é possível observar que os maiores valores para ΔI foram obtidos aplicando 10 ciclos voltamétricos para a eletropolimerização do IAA na presença de ácido málico.

Figura 39- Resposta em ΔI para o efeito do número de ciclos voltamétricos na eletropolimerização de IAA numa concentração de $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ácido málico $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: elaborado pelo autor

Analisando o gráfico da Figura 39 pode-se observar que quando o número de ciclos foi superior a 10 a resposta em variação de corrente para o MIP apresentou uma queda, possivelmente por que nessa condição foi obtido um filme polimérico muito espesso na superfície do eletrodo, assim algumas moléculas de ácido málico impressas na região mais profunda da matriz polimérica podem não ter sido removidas, formando assim um número inferior de sítios seletivos de reconhecimento.

Quando o número de ciclos foi inferior a 10 também foi observada uma menor resposta em variação de corrente para a sonda, nessa situação possivelmente o filme polimérico obtido apresenta uma elevada rugosidade, o que favorece processos de adsorção não específicos, levando a uma menor taxa de remoção e religação.

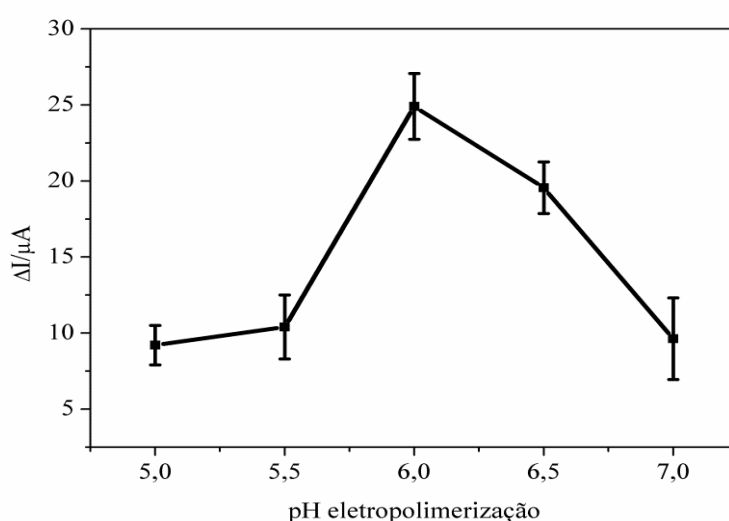
Dessa maneira foi selecionado o número de 10 ciclos voltamétricos sucessivos para a eletropolimerização de IAA na presença de ácido málico sobre a superfície GCE-RGO-CuNPs para a construção do sensor.

4.2.3.2 Influência do pH do meio no processo de eletropolimerização

Outro parâmetro que tem demonstrado influência direta no desempenho de sensores baseados em MIP é o pH da solução utilizada como meio para a realização do processo de eletropolimerização do monômero.

O meio tem demonstrado participação importante na formação dos radicais que desencadeiam o processo de polimerização na superfície do eletrodo. Esse estudo foi realizado em soluções de tampão PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com valores de pH variando de 5,0 a 7,0 os resultados obtidos para este estudo estão na Figura 40.

Figura 40- Resposta para o efeito da variação do pH da solução utilizada como meio para a eletropoimerização do monômero IAA numa concentração de $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido málico.



Fonte: elaborado pelo autor

A literatura mostra que os melhores resultados para a polimerização do monômero IAA são obtidos em meio que apresenta pH fracamente ácido, com valores próximos da neutralidade, isso porque nesses meios os grupos das moléculas de IAA apresentam a capacidade de condensação com outras moléculas de IAA promovendo assim o crescimento da cadeia polimérica.

Analisando os dados obtidos observa-se que a maior resposta em variação de corrente para o sensor foi alcançada com o pH 6,0, assim esse valor de pH foi selecionado para realizar a polimerização do monômero na etapas seguintes de construção do sensor.

4.2.3.3 Efeito da razão molar entre IAA e ácido málico

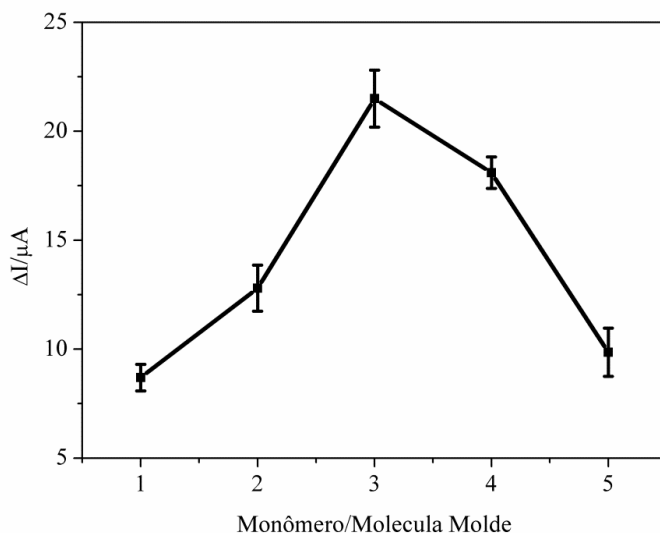
A razão entre as concentrações molares do monômero funcional (IAA) e da molécula molde (ácido málico) tem demonstrado influenciar diretamente no número de sítios seletivos de reconhecimento impressos na superfície do eletrodo durante o processo de polimerização, assim este é outro parâmetro que deve ser cuidadosamente otimizado durante a construção de um MIP.

De maneira geral é utilizado um excesso de monômero funcional em relação à molécula molde, pois isso pode permitir a obtenção de mais sítios seletivos de ligação para o analito no polímero formado. No entanto se esta razão for excessivamente grande pode ocorrer à formação de sítios não seletivos de reconhecimento na matriz polimérica pelo excesso de grupos funcionais do monômero, o que pode levar a processos de adsorção não específicos no MIP, afetando assim a seletividade do sensor.

Para este trabalho a razão molar de IAA para ácido málico foi estudada no intervalo de 1:1 até 5:1, para tal a concentração de IAA foi mantida constante $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ variando-se a concentração do ácido málico (molécula molde), os resultados obtidos são mostrados na Figura 41.

Analisando a Figura 41 é possível observar que a razão molar que apresentou melhor resposta em variação de corrente para a sensor foi 3:1 (IAA: ácido málico), quando a razão foi menor a resposta apresentou uma queda significativa, isso por que a quantidade de IAA presente não foi suficiente para se combinar com todas as moléculas de ácido málico, sendo formado assim um número reduzido de sítios seletivos.

Figura 41 - Resposta em variação de corrente para o efeito da razão molar entre o monômero IAA e ácido málico (molécula molde) no processo de polimerização, para uma concentração de $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de IAA em tampão PBS com pH 6,0.



Fonte: elaborado pelo autor

Quando a razão foi maior que 3:1 a quantidade excessiva de IAA presente pode ter dificultado o processo de remoção da molécula molde e até mesmo obstruído alguns sítios seletivos formados na etapa de remoção, dificultando assim o processo de reconhecimento para o analito na etapa de religação, assim a razão molar (IAA:ácido málico) de 3:1 foi utilizada para a preparação do sensor.

4.2.3.4 Efeito do número de ciclos voltamétricos para a remoção da molécula molde

Como anteriormente destacado uma das grandes vantagens de se trabalhar com MIP é a seletividade superior oferecida por esses materiais, assim uma das etapas mais importantes na construção de um MIP é a obtenção da cavidade seletiva para o reconhecimento do analito, isso acontece na etapa de remoção da molécula molde impressa na matriz polimérica durante a polimerização.

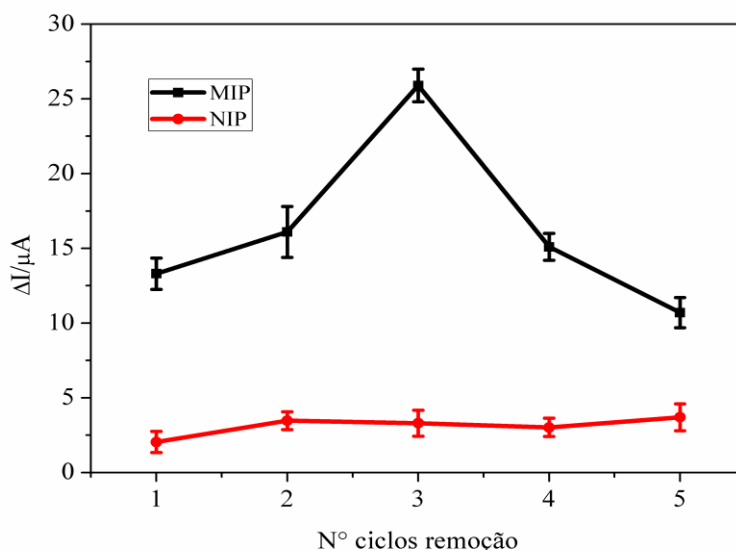
Esta etapa de remoção também é importante para assegurar uma boa sensibilidade para o sensor, visto que a mesma tem relação direta com o número e a uniformidade dos sítios seletivos obtidos, assim a etapa de remoção também precisa ser cuidadosamente estudada durante a construção de um MIP.

Os resultados obtidos em variação de corrente para o sensor estão apresentados na Figura 42, como pode ser observado os maiores valores para a resposta do sensor foram obtidos aplicando 3 ciclos voltamétricos sucessivos para a remoção da molécula molde em meio NaOH 0,10 mol L⁻¹.

Quando o número de ciclos voltamétricos foi maior que 3 foi observada uma diminuição para a resposta do sensor, possivelmente por que nessas condições o filme foi completamente removido da superfície do eletrodo, não sendo observado diferenças significativas entre os valores de corrente para a oxidação da sonda antes e depois do processo de religação.

Por outro lado, com um número de ciclos inferior a 3 provavelmente não foi possível a remoção de todas as moléculas de ácido de málico da matriz polimérica, formando assim um número inferior de sítios de reconhecimento, o que fornece uma resposta em corrente não muito significativa para a sonda após a remoção da molécula molde.

Figura 42- Influência do número de ciclos voltamétricos aplicados na etapa de extração da molécula molde na resposta em variação de corrente para o sensor impresso (GCE-RGO-CuNPs-MIP) e não impresso (GCE-RGO-CuNPs-NIP).



Fonte: elaborado pelo autor

Com o intuito de comprovar o processo de impressão molecular a remoção também foi estudada para o sensor não impresso GCE-RGO-CuNPs-NIP, onde a eletropolimerização foi realizada na ausência da molécula molde (ácido málico) e posteriormente também sendo

realizada a etapa de remoção de maneira semelhante à realizada com o sensor impresso GCE-RGO-CuNPs-MIP, os resultados obtidos em termos de variação de corrente também estão apresentados na Figura 42.

Analisando a Figura 42 é possível observar claramente que os valores de variação de corrente para o sensor impresso GCE-RGO-CuNPs-MIP são significativamente maiores quando comparados com os valores obtidos para o sensor não impresso GCE-RGO-CuNPs-NIP, onde a resposta praticamente não varia com a mudança no número de ciclos voltamétricos aplicados para a remoção.

Isso acontece pelo fato de não ocorrer formação de cavidade seletiva para a religação no NIP, assim as respostas em corrente para a sonda eletroquímica não demonstram diferenças significativas após a remoção e após a etapa de religação, resultando num baixo valor para ΔI .

4.2.3.5 Influência do tempo de religação

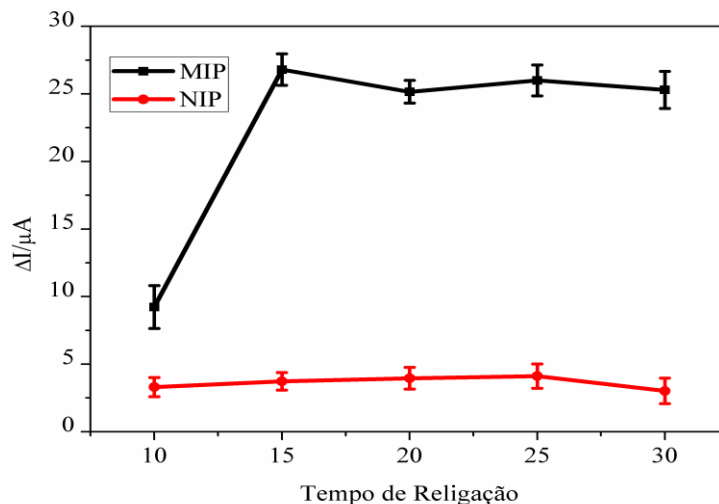
Após o estudo para a etapa de remoção da molécula molde da matriz polimérica foi realizado o estudo do tempo de religação para o analito nas cavidades obtidas, este estudo se mostra importante para avaliar o processo de religação das moléculas de ácido málico nas cavidades seletivas de reconhecimento.

Neste estudo, após a remoção, o eletrodo foi imerso numa solução de ácido málico $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação branda para a religação, foram avaliados os tempos de 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de contato para a religação do ácido málico, os resultados obtidos para a variação de corrente estão apresentados na Figura 43.

Analisando a Figura 43 é possível observar que após o tempo de 15 minutos de contato do eletrodo com a solução de ácido málico é obtida uma resposta constante em variação de corrente para o sensor, indicando que foi alcançada uma condição estacionária para a religação do analito nas cavidades seletivas do MIP, dessa maneira este foi o tempo selecionado para a etapa de religação do analito nas cavidades seletivas do MIP.

Ainda analisando a Figura 43 pode ser observado que a resposta em variação de corrente para o sensor não impresso GCE-RGO-CuNPs-NIP mais uma vez é consideravelmente menor quando comparada com a resposta para o sensor impresso GCE-RGO-AuNPs-MIP, reafirmando o sucesso no processo de impressão molecular.

Figura 43- Influência do tempo de religação do ácido málico, numa concentração $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, na resposta em variação de corrente para o sensor impresso (GCE-RGO-CuNPs-MIP) e não impresso (GCE-RGO-CuNPs- NIP).



Fonte: elaborado pelo autor

4.2.4 Caracterização morfológica da superfície do sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP

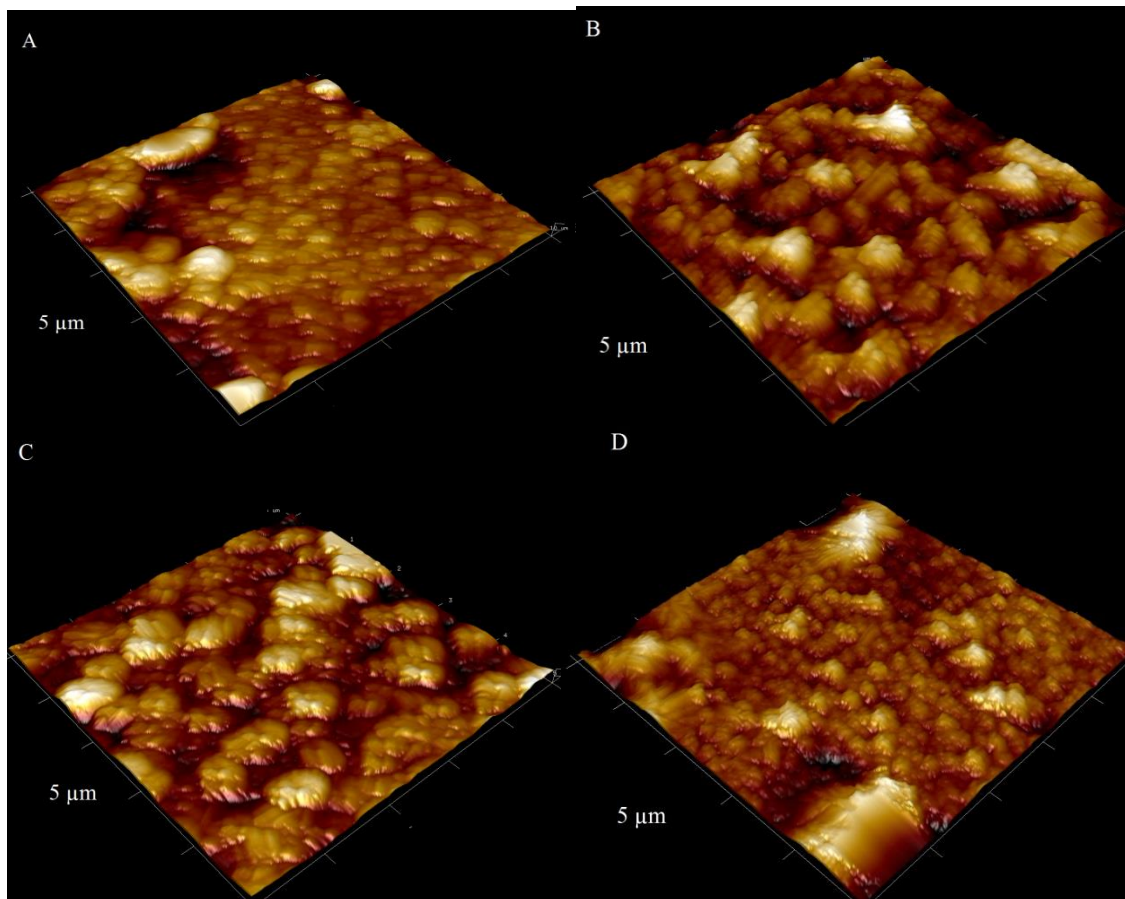
Após a otimização de todos os parâmetros para a construção do MIP foi realizada uma caracterização da superfície do eletrodo modificado para cada uma destas etapas de construção do MIP com o objetivo de investigar possíveis mudanças na superfície do eletrodo, para tal foi utilizada a técnica de AFM a qual permite a obtenção de várias informações sobre a superfície investigada.

As imagens obtidas para eletrodo GCE-RGO-CuNPs-MIP utilizando essa técnica permitem analisar uma série de fatores de interesse durante o processo de impressão molecular, as quais podem ser relacionadas com a rugosidade do filme polimérico obtido na superfície modificada do eletrodo através dos valores da chamada RMS, obtidos após cada análise. As imagens tridimensionais de AFM obtidas durante as etapas de preparo do MIP estão apresentadas na Figura 44.

A Figura 44A, obtida para o sensor após o processo de polimerização do monômero IAA sobre a superfície modificada com RGO-CuNPs apresentou uma rugosidade $RMS=27,3 \text{ nm}$, confirmando a obtenção de um filme fino e altamente compacto na superfície do eletrodo. Após a remoção da molécula molde, Figura 43B, para a obtenção das cavidades seletivas

observa-se um aumento significativo para a rugosidade com o valor de RMS (58,1 nm), justificado pela formação dos sítios seletivos de reconhecimento.

Figura 44- Imagens AFM para: (A) GCE-RGO-CuNPs-MIP, (B) GCE-RGO-CuNPs-MIP remoção, (C) GCE-RGO-CuNPs-MIP religação e (D) GCE-RGO-CuNPs-NIP



Fonte: elaborado pelo autor

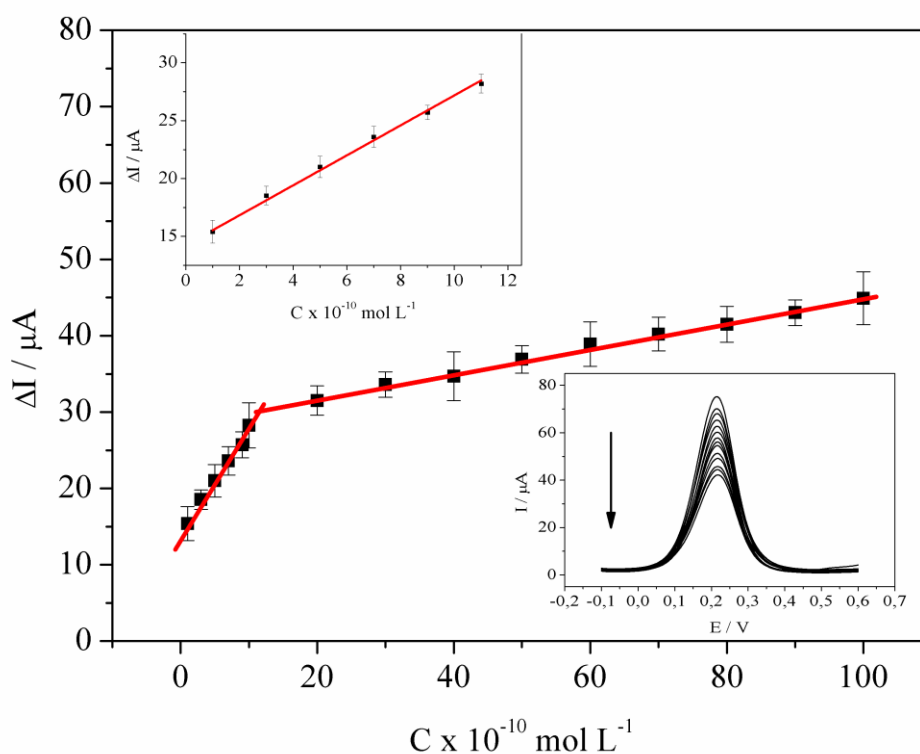
Após o processo de religação, Figura 43C, foi observada uma diminuição na rugosidade do filme polimérico na superfície do eletrodo (RMS=41,7 nm), indicando que algumas cavidades da matriz polimérica foram ocupadas. Para o NIP, Figura 43D, valores semelhantes de rugosidades foram encontrados quando comparados com o MIP, apresentando uma rugosidade RMS= 21,7 nm.

4.2.5 Desempenho analítico do sensor GCE-RGO-CuNPs

Após a otimização de todas as condições experimentais, preparação e caracterização do MIP sobre a superfície modificada com RGO-CuNPs, curvas analíticas foram obtidas para avaliar o desempenho analítico do sensor proposto para a determinação de ácido málico.

A técnica de DPV foi utilizada para a obtenção do sinal analítico para a sonda eletroquímica após sucessivas etapas de religação para o ácido málico em diferentes concentrações, a Figura 45 mostra a curva analítica obtida.

Figura 45- Curva analítica para o sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP obtida após sucessivas adições de ácido málico, após 15 minutos de contato. Figura interna superior: primeira região linear do sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP para um intervalo de concentrações de ácido málico de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. Figura interna inferior: voltamogramas DPV para a oxidação da sonda após cada etapa de religação do ácido málico no intervalo de concentrações de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.



Fonte: elaborado pelo autor

Após a remoção da molécula molde de ácido málico impressa na matriz polimérica de IAA o eletrodo foi submetido ao processo de religação utilizando soluções de diferentes concentrações de ácido málico com um tempo de contato de 15 minutos sob agitação branda (aproximadamente 50 rpm).

Após cada etapa de religação foi medida a corrente para a oxidação para a sonda eletroquímica, utilizada para o cálculo da variação de corrente e posterior construção da curva

analítica. Os voltamogramas obtidos com a técnica de DPV após cada uma das religações estão na inserção da Figura 45, mostram uma diminuição progressiva da corrente de pico para a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ com o aumento da concentração de ácido málico religado nas cavidades do MIP.

Tal comportamento indica que um número de cavidades impressas cada vez maior foi sendo ocupado a cada etapa de religação para o ácido málico, dificultando assim a chegada da sonda até a superfície do eletrodo para o processo de transferência eletrônica.

A Figura 45 mostra que a resposta em corrente para a sonda eletroquímica após sucessivas religações de ácido málico nas cavidades do MIP é proporcional à concentração do ácido em duas faixas de concentrações: a primeira faixa linear vai de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e a segunda faixa de $2,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

As figuras de mérito para o sensor desenvolvido foram calculadas utilizando a primeira faixa linear de concentração, a qual apresentou a seguinte equação de correlação linear: $\Delta I = 1,29 \times 10^4 C_{\text{ácido málico}} (\text{mol L}^{-1}) + 1,42 \times 10^{-5}$, foram calculados os valores de sensibilidade amperométrica, limite de detecção ($\text{LD} = 3s/\text{slope}$) para $n=3$ e limite de quantificação ($\text{LQ} = 10s/\text{slope}$) para $n=3$, com $1,3 \times 10^4$ mA L mol⁻¹, $6,6 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹ e $2,2 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹, respectivamente.

A Tabela 4 mostra uma comparação entre o sensor desenvolvido GCE-RGO-AuNPs-MIP para a determinação de ácido málico com outros sensores disponíveis na literatura para a mesma determinação, sendo possível observar que o sensor desenvolvido no presente trabalho apresentou menores valores para LD e LQ e uma ampla faixa linear.

Tabela 4- Comparação entre os sensores disponíveis na literatura para determinação de ácido málico com o método desenvolvido no presente trabalho

Método de detecção	Limite de detecção (mol L ⁻¹)	Intervalo linear (mol L ⁻¹)	Referência
SWNT-NADH	$0,5 \times 10^{-6}$	0,2 a $1,0 \times 10^{-3}$	[63]
Screen printed	$0,027 \times 10^{-3}$	0,028 a $0,7 \times 10^{-3}$	[64]
Eletrodo de platina	$3,0 \times 10^{-6}$	$4,0 \times 10^{-4}$ a 10^{-5}	[65]
GCE-RGO-CuNPs-MIP	$6,6 \times 10^{-11}$	$1,0 \times 10^{-10}$ a 10^{-8}	Este trabalho

A existência de duas faixas lineares em sensores eletroquímicos baseados em MIP é um fato reportado com certa frequência na literatura, isso acontece por conta da presença de cavidades seletivas no MIP com diferentes graus de afinidades pela molécula do analito, o que tem relação com a espessura do filme polimérico obtido.

Desse modo quando GCE-RGO-CuNPs-MIP é imerso numa solução de ácido málico as moléculas desse ácido irão ocupar as cavidades mais superficiais, que apresentam maior afinidade, à medida que a concentração do ácido aumenta essas cavidades vão sendo completamente ocupadas.

Nessa situação as moléculas que ainda não estão religadas procuram cavidades livres, localizadas mais internamente na matriz polimérica, as quais demonstram uma menor afinidade para a religação, principalmente devido às dificuldades difusionais que as moléculas do analito precisam vencer no interior do MIP para alcançar as cavidades seletivas.

Assim a marcante diminuição do coeficiente angular da curva, com o surgimento da segunda faixa linear, tem relação com as dificuldades de transferência de massa que as moléculas do ácido precisam superar no interior da matriz polimérica para alcançar uma cavidade e realizar o processo de religação.

4.2.6 Estudos de isoterma de adsorção

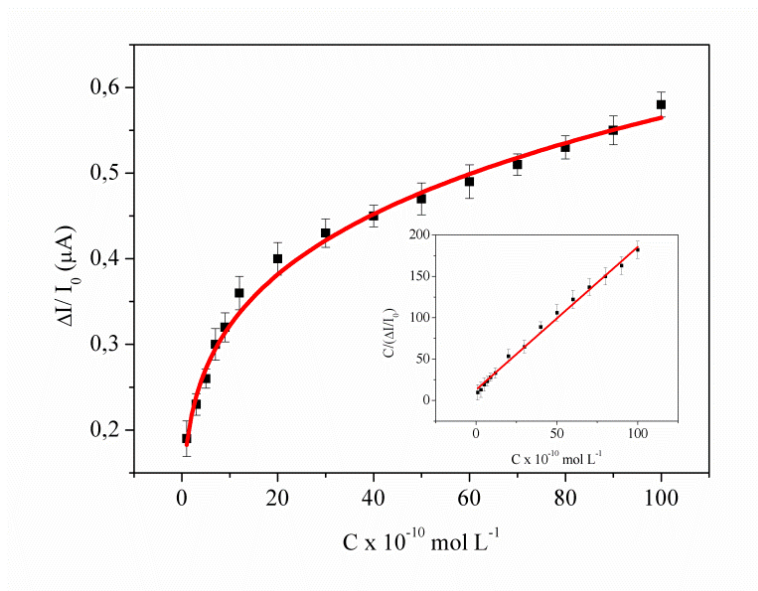
Com o objetivo de estudar as propriedades de ligação das moléculas de ácido málico nas cavidades do MIP foi realizado um estudo de adsorção, aplicando a isoterma de Langmuir.

O chamado parâmetro de equilíbrio, dado pela constante de dissociação do equilíbrio (K_d) pode ser calculado a partir da Equação 2, [81,82], permitindo assim um estudo quantitativo das interações responsáveis pelo reconhecimento seletivo do MIP.

A Figura 46 mostra a isoterma de Langmuir obtida para o intervalo de concentrações para o ácido málico estudado no sensor proposto.

O valor de K_d obtido a partir da curva linearizada foi de $5,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($R = 0,998$), confirmando que o ácido málico exibiu uma elevada afinidade pelas cavidades de reconhecimento do MIP desenvolvido.

Figura 46- Isoterma de ligação para o eletrodo GCE-RGO-CuNPs-MIP após a religação com diferentes concentrações de ácido málico. Figura interna: curva linearizada para a adsorção de ácido málico no MIP.



Fonte: elaborado pelo autor

4.2.7 Estudo de interferentes

O reconhecimento seletivo oferecido pelo MIP para a molécula de interesse se deve ao tamanho da molécula e à presença de grupos funcionais capazes de interagir com os grupos funcionais presentes na cavidade seletiva de reconhecimento.

Assim moléculas que apresentam os mesmos grupos funcionais e tamanhos semelhantes à molécula molde podem atuar como interferentes na resposta do sensor, uma vez que podem também ocupar algumas cavidades no polímero.

Para avaliar a seletividade do sensor desenvolvido foram realizados estudos de religação para diferentes moléculas que podem atuar como interferentes para o ácido málico.

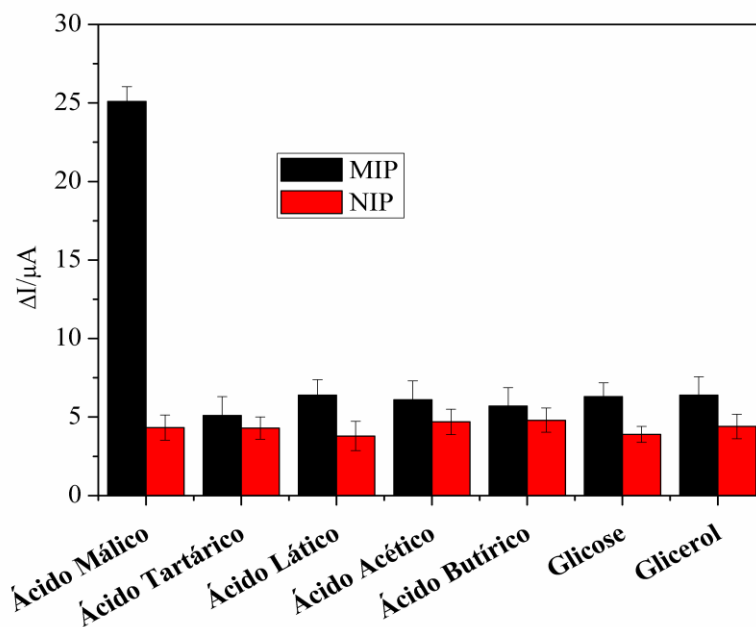
O procedimento aplicado para a obtenção do sinal em variação de corrente para as diferentes moléculas estudadas, que permitiu avaliar a seletividade do sensor foi o mesmo aplicado na obtenção de sinal para o ácido málico, com a única diferença na etapa de religação, onde os possíveis interferentes substituíram o analito, investigando assim a possibilidade da cavidade seletiva formada para o ácido málico interagir com outras moléculas.

A avaliação foi realizada através dos valores obtidos para a variação de corrente da sonda após a remoção e após a religação, de acordo com a Equação 01

Dessa maneira após 15 minutos de religação para cada um dos interferentes foi calculado a resposta em variação de corrente para a oxidação da sonda, na Figura 47 são apresentadas as resposta obtidas para cada uma dessas moléculas, bem como a resposta obtida após a religação para o ácido málico.

Analisando a Figura 47 é possível observar que o sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP apresenta boa seletividade para o ácido málico, pois as respostas em variação de corrente (ΔI) para a sonda após a religação do analito é aproximadamente 4 vezes maior quando comparada com as respostas obtidas em variação de corrente para a sonda após a religação de cada um dos possíveis interferentes estudados, os quais estão presentes na vinhaça de cana de açúcar.

Figura 47- Estudo de interferentes para o sensor impresso GCE-RGO-CuNPs-MIP e não impresso GCE-RGO-CuNPs-NIP, resposta em variação de corrente após a religação com uma solução de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de: ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, glicose e glicerol.



Fonte: elaborado pelo autor

Esse comportamento comprova que as condições experimentais otimizadas para a impressão molecular, remoção e religação foram adequadas para a obtenção de cavidades com elevado grau de seletividade para o ácido málico.

A seletividade também foi avaliada por outros dois parâmetros: o chamado fator de impressão molecular (α), a qual permite comparar a resposta do sensor impresso com a resposta do sensor não impresso, e o chamado fator de seletividade (β), o qual permite avaliar a resposta do sensor para o analito em relação à resposta para um grupo de possíveis interferentes, calculados pelas Equações 2 e 3, respectivamente.

Os valores calculados dessas duas grandezas para o analito e para todos os interferentes estudados estão apresentados na Tabela 5.

O fator de impressão α avalia a capacidade das cavidades do MIP desenvolvido interagir diretamente com as moléculas do analito, como esperado os valores calculados para o ácido málico são maiores quando comparados com os valores calculados para os interferentes, evidenciando assim que as cavidades impressas obtidas são seletivas para o analito, fato confirmado com os valores de β .

Tabela 5- Parâmetros de seletividade para o sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP e GCE-RGO-CuNPs-NIP

Molécula	MIP (μA)	NIP (μA)	α	β
Ácido málico	25,1	4,3	5,8	1
Ácido tartárico	5,1	4,2	1,2	4,8
Ácido láctico	6,4	3,8	1,7	3,6
Ácido acético	6,1	4,7	1,3	4,5
Ácido butírico	5,7	4,8	1,2	4,8
Glicose	6,3	3,9	1,6	3,6
Glicerol	6,4	4,4	1,4	4,1

4.2.8 Determinação de ácido málico em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar

Para a determinação de ácido málico em amostras de vinhaça de cana de-açúcar algumas alíquotas da amostra foram diluídas conforme descrita na parte experimental.

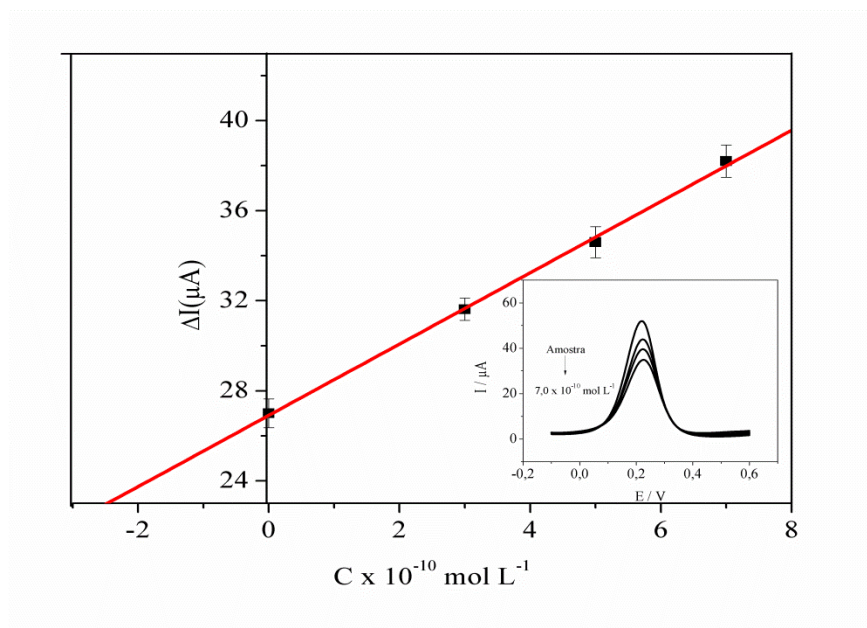
A determinação foi realizada utilizando o método de adição de padrão, o qual consiste resumidamente em adicionar concentrações conhecidas do analito (ácido málico) num volume conhecido da amostra de vinhaça de cana de açúcar.

As amostras de vinhaça enriquecidas com quantidades conhecidas de ácido málico foram utilizadas para um processo de religação durante o intervalo de tempo otimizado e posterior obtenção do sinal analítico para a sonda.

Para tal foi utilizada a técnica de DPV, os resultados obtidos permitiram a construção de uma curva de adição de padrão relacionando a concentração adicionada de ácido málico à amostra com as respectivas respostas em variação de corrente (ΔI) para a sonda, apresentada na Figura 48.

O ponto que a curva analítica encontra o eixo das ordenadas corresponde à resposta em corrente para a sonda relacionada à espécie analisada, sem qualquer adição de padrão, nesse contexto a extrapolação da curva no eixo das abscissas corresponde à concentração real do analito na amostra de vinhaça de cana de açúcar analisada.

Figura 48- Curva de adição de padrão para a determinação de ácido málico em amostras de vinhaça de cana de açúcar



Fonte: elaborado pelo autor

A Figura 48 apresenta curva analítica obtida, após a adição de padrão com concentrações conhecidas de ácido málico ($3,0$; $5,0$; $7,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) em amostras de vinhaça de cana de açúcar.

Analizando a Figura 48, é possível observar que a resposta em variação de corrente para a sonda varia linearmente com as concentrações de ácido málico adicionadas à amostra

de vinhaça, de acordo com a seguinte equação de correlação linear: $\Delta I = 2,70 \times 10^{-5} C$ (ácido málico) + $1,58 \times 10^{-4}$ ($r=0,9996$).

A inserção da Figura 48 mostra as respostas obtidas com a técnica DPV para a oxidação da sonda após o processo de religação para cada uma das adições de ácido málico realizadas na amostra de vinhaça de cana de açúcar.

A concentração de ácido málico determinada, após a extrapolação da reta, nas amostras de vinhaça de cana de açúcar estudadas foi: $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \pm 2,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.9 Validação do método analítico desenvolvido

A etapa de validação é de extrema importância para confirmar a adequação da metodologia desenvolvida para a determinação do analito de interesse na matriz estudada, nesse sentido o ensaio de recuperação é um dos procedimentos mais aplicados para a validação de métodos analíticos.

Os ensaios de recuperação foram realizados por meio da chamada fortificação da amostra, com a adição de diferentes concentrações de ácido málico em amostras de vinhaça de cana de açúcar, após cada adição realizou-se a determinação do ácido na amostra, sendo possível calcular assim o valor recuperado.

A Tabela 6 mostra os valores adicionados e recuperados nesse estudo, além da percentagem de recuperação, desvio padrão para as medidas e os valores de $t_{\text{calculado}}$.

Tabela 6- Ensaios de recuperação para o ácido málico em amostras de vinhaça de cana de açúcar

Amostra	Quantidade adicionada ($\times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$)	Quantidade detectada ($\times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD	$t_{\text{calculado}}$
Vinhaça de cana de açúcar*	3,0	$3,12 \pm 0,12$	104	4,1	3,7
	5,0	$4,87 \pm 0,17$	97,4	2,7	-1,5
	7,0	$6,92 \pm 0,19$	98,8	4,3	1,2

*Quantidade de ácido málico detectada na amostra = $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \pm 2,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$

$t_{\text{tabelado}} = 4,3$ para um nível de confiança de 95%

Como pode ser observado na Tabela 06, as recuperações médias variaram de 104 % a 97,4% com valores de RSD entre 4,3% e 2,7%, esses resultados indicam que o método desenvolvido apresenta boa exatidão para a determinação de ácido málico em amostras de

vinhaça de cana de açúcar e a resposta do sensor não sofre efeitos significativos da matriz estudada.

As concentrações encontradas foram ainda comparadas estatisticamente com as concentrações de adicionadas aplicando o chamado teste t de Student não pareado, os resultados foram obtidos para um nível de confiança de 95%.

Como observado na Tabela 6, os valores para $t_{\text{calculado}}$ foram menores comparados com os valores de t_{tabelado} , indicando, portanto que o sensor desenvolvido pode ser aplicado com sucesso para a determinação de ácido málico em vinhaça de cana de açúcar.

4.2.10 Conclusões parciais

Neste trabalho foi desenvolvido um sensor eletroquímico baseado em MIP para a determinação de ácido málico em vinhaça de cana de açúcar. O MIP foi obtido por meio da eletropolimerização do monômero IAA na superfície do eletrodo de GCE modificada com RGO e CuNPs.

Os resultados obtidos utilizando as técnicas de VC, EIE, MEV e AFM permitiram confirmar que as modificações realizadas na superfície do eletrodo, inicialmente com RGO e CuNPs e depois com a formação do MIP, foram alcançadas com sucesso, sendo possível comprovar a formação do filme polimérico sobre a superfície do eletrodo modificado.

As otimizações dos parâmetros experimentais para a modificação do eletrodo e construção do MIP permitiram potencializar o desempenho analítico do sensor, melhorando sua sensibilidade, seletividade e limites de detecção e quantificação.

As duas faixas lineares de concentração obtidas para o ácido málico foram estudadas em termos da isoterma de Langmuir, permitindo confirmar, por meio do valor calculado para K_d , uma boa afinidade de reconhecimento para as moléculas de ácido málico nas cavidades seletivas do MIP.

A resposta do sensor GCE-RGO-CuNPs-MIP para moléculas com estruturas e grupos funcionais semelhantes ao ácido málico presentes na vinhaça, e que podem se comportar como interferentes na determinação, demonstrou que as cavidades de reconhecimento obtidos no MIP apresentam boa seletividade para o ácido málico.

O sensor desenvolvido foi aplicado com sucesso na determinação de ácido málico em amostras de vinhaça de cana de açúcar, com recuperações médias variando de 97,4% a 104% com RDS variando de 2,70% a 4,31%, indicando que método desenvolvido apresenta boa exatidão para a determinação de ácido láctico e não sofre efeito de matriz.

Dessa maneira os resultados obtidos indicam que o sensor desenvolvido baseado em MIP sobre uma superfície modifica portando RGO e CuNPs pode ser aplicado pra a determinação de ácido málico em amostras de vinhaça de cana de açúcar, permitindo assim quantificar esse importante ácido.

5 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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