

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

ALÉXIA MASSINATORE ZANCAN

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS PARA DETERMINAÇÃO DE
LIMONENO EM RESÍDUOS INDUSTRIAIS DA PRODUÇÃO DE SUCO DE
LARANJA**

ARARAQUARA

2023

Aléxia Massinatore Zancan

Desenvolvimento de sensor eletroquímico baseado em polímeros molecularmente impressos para determinação de limoneno em resíduos industriais da produção de suco de laranja

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

Colaborador: Dr. José Luiz da Silva

Araraquara

2023


ALÉXIA MASSINATORE ZANCAN

Desenvolvimento de sensor eletroquímico baseado em polímeros molecularmente impressos para determinação de limoneno em resíduos industriais da produção de suco de laranja

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.


Araraquara, 15 de dezembro de 2023.

Banca examinadora

 Documento assinado digitalmente
NELSON RAMOS STRADIOTTO
Data: 21/12/2023 12:37:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

 Documento assinado digitalmente
DENIS RICARDO MARTINS DE GODOI
Data: 22/12/2023 18:07:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Denis Ricardo Martins de Godoi

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

 Documento assinado digitalmente
BARBARA CAMILA DE ARAUJO SOUZA
Data: 21/12/2023 11:06:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Bárbara Camila de Araújo Souza

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, pelo incentivo aos estudos e pelo apoio constante durante minha jornada acadêmica. Agradeço especialmente à minha mãe, Valéria, por ser um exemplo de superação e força, e ao meu pai, Marcos, pelo cuidado incondicional.

Ao Prof. Dr. Nelson Stradiotto por ter me acolhido e me dado a oportunidade de trabalhar em um grupo de pesquisa único. Ao meu “chefinho”, o Dr. José Luiz, por ter a paciência e a atenção que foram fundamentais para que eu me tornasse a cientista que sou hoje.

À Gabriela, Maísa, Max, Emanuela, Bruna e ao querido Edervaldo (*in memoriam*), além de muitos outros que passaram pelo laboratório e faziam meu dia a dia mais descontraído.

Aos amigos que fiz pelo caminho e transformaram minha vivência em Araraquara. Aos queridos que me acolheram na Turma 04, Lucas, Vitor, Sara e Leticia, que sempre estiveram presentes e dispostos a me ajudar ou aconselhar nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos de Campinas por estarem presentes desde minha adolescência e acompanharem meu crescimento e formação profissional com incentivos constantes.

Ao Higor por ser uma das primeiras pessoas a se aproximar de mim na Engenharia e por ser insurportavelmente indispensável como amigo. Obrigada pelas noites de filmes e jogos e pela companhia nessa jornada.

À Fernanda por ser uma enciclopédia de conhecimentos e conselhos, sempre disposta a me ensinar e a me apoiar. É imensurável a diferença que você e sua amizade fazem na minha vida. Obrigada por estar presente e por cuidar de mim quando eu mesma não dou conta.

À Universidade Estadual Paulista e ao Instituto de Química - Campus Araraquara, corpo docente, e membros da direção e administração, por todo o suporte durante minha graduação e por proporcionarem um ambiente propício ao aprendizado constante.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e institucional na realização do trabalho de pesquisa (Processos 123440/2019-0 e 408783/2018-4). Ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do aparelho de SEM-FEG.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha trajetória na Unesp e ficaram marcados na minha história.

RESUMO

A “água amarela” é a água residuária da indústria de processamento da laranja. É uma expressiva fonte de subprodutos de alto valor agregado que pode representar um grande problema ambiental, caso descartado incorretamente e por essa razão, desperta o interesse de estudos voltados à recuperação e ao reaproveitamento de matérias-primas, como o limoneno. Esse composto químico é o principal constituinte da fração oleosa do óleo essencial obtido da casca da laranja. A baixa toxicidade do limoneno e sua diversificada aplicação em indústrias como a alimentícia, a farmacêutica e a química, o tornam um subproduto de grande relevância comercial. Assim, é de extrema importância o desenvolvimento de novos métodos para determinação do limoneno, com destaque para as técnicas eletroanalíticas, que representam uma alternativa mais econômica e menos complexa em comparação as técnicas cromatográficas, atualmente utilizadas com maior frequência para a detecção de limoneno. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de um novo sensor eletroquímico baseado em polímero molecularmente impresso (MIP) para a determinação de limoneno em águas residuárias da indústria de laranja. O sensor MIP foi construído através da eletropolimerização de pirrol na presença de limoneno na superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE/MIP). O eletrodo modificado foi caracterizado usando técnicas eletroquímicas, microscópicas e espectroscópicas. Em condições otimizadas, o sensor GCE/MIP proposto apresentou faixa linear de 1,0 a 100 pmol L⁻¹ com alta sensibilidade ($9,0 \times 10^{11}$ nA mol⁻¹ L) e baixo limite de detecção (0,87 pmol L⁻¹), bem como uma excelente estabilidade de armazenamento, de repetibilidade e de reprodutibilidade. O fator de impressão encontrado para o sensor MIP foi de 4,1 – alta seletividade. A aplicabilidade do sensor foi avaliada com sucesso pela determinação de limoneno em amostras de efluentes da indústria da laranja. O GCE/MIP apresentou recuperação entre 98 e 105%. Os resultados, em conjunto, indicam que o sensor GCE/MIP pode fornecer um método sensível e seletivo para determinação de limoneno com exatidão e precisão, o que evidencia a valorização de subprodutos recuperados de rejeitos industriais.

Palavras-chave: detecção de limoneno; polímeros molecularmente impressos; eletropolimerização; sensor eletroquímico; resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

“Yellow water” is wastewater from the orange processing industry. It is a significant source of high-value by-products that can represent a major environmental problem if discarded incorrectly and for this reason, it arouses the interest of studies aimed at the recovery and reuse of raw materials, such as limonene. This chemical compound is the main constituent of the oily fraction of essential oil obtained from orange peel. The low toxicity of limonene and its diverse application in industries such as food, pharmaceuticals and chemicals make it a by-product of great commercial relevance. For this reason, it is extremely important to develop new methods for the determination of limonene, with emphasis on electroanalytical techniques, which represent a more economical and less complex alternative compared to chromatographic techniques, currently used more frequently for the detection of limonene. Therefore, the main objective of the present work is to develop a new electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer (MIP) for the determination of limonene in wastewater from the orange industry. The MIP sensor was constructed through the electropolymerization of pyrrole in the presence of limonene on the surface of a glassy carbon electrode (GCE/MIP). The modified electrode was characterized using electrochemical, microscopic and spectroscopic techniques. Under optimized conditions, the proposed GCE/MIP sensor presented a linear range from 1,0 to 100 pmol L⁻¹ with high sensitivity ($9,0 \times 10^{11}$ nA mol⁻¹ L) and low detection limit (0,87 pmol L⁻¹), as well as excellent storage stability, repeatability and reproducibility. The impression factor found for the MIP sensor was 4,1 – high selectivity. The applicability of the sensor was successfully evaluated by determining limonene in effluent samples from the orange industry. GCE/MIP showed recovery between 98 and 105%. The results, taken together, indicate that the GCE/MIP sensor can provide a sensitive and selective method for determining limonene with accuracy and precision, which highlights the valorization of by-products recovered from industrial waste.

Keywords: limonene detection; molecularly imprinted polymers; electropolymerization; electrochemical sensor; agro-industrial wastes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção em Toneladas de Suco Concentrado Congelado (FCOJ Equivalente a 66° brix).	11
Figura 2. Estrutura molecular do limoneno.	13
Figura 3. Esquema ilustrativo da aplicação de um sensor eletroquímico.	15
Figura 4. Esquema ilustrativo da construção de um polímero molecularmente impresso (MIP).	16
Figura 5. Imagem ilustrativa do potenciostato/galvanostato PalmSens®.	20
Figura 6. Esquema ilustrativo das etapas de construção do sensor GCE/MIP.	21
Figura 7. CVs na ausência (a) e presença (b) de limoneno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solução de acetonitrila contendo LiClO_4 100 mmol L^{-1} . Condições: v de 50 mV s^{-1}	25
Figura 8. CVs de eletropolimerização de pirrol na superfície do GCE para (a) MIP e (b) NIP. Condições: faixa de potencial 0,0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) com v de 50 mV s^{-1} por 10 ciclos.	26
Figura 9. CVs da extração de limoneno por superoxidação de PPy em solução de NaOH 100 mmol L^{-1} . Condições: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e 8 ciclos sucessivos.	27
Figura 10. Efeito das concentrações de limoneno (a) e pirrol (b) utilizadas na eletropolimerização, número de ciclos de polimerização (c) e extração (d) e tempo de religação do limoneno (e), $n = 3$. Condições: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	29
Figura 11. CVs de (a) GCE, (b) GCE/MIP após extração com limoneno e (c) GCE/MIP após 15 minutos de religação em solução de limoneno $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em LiClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	31
Figura 12. Análise EIS de (a) GCE, (b) GCE/MIP após eletropolimerização, (c) GCE/MIP após extração de limoneno, (d) GCE/MIP após religação de limoneno e (e) GCE/NIP após eletropolimerização. (f) Circuito eletroquímico equivalente usado para ajustar os diagramas de EIS.	32
Figura 13. Imagens SEM-FEG de (a) GCE/NIP após extração, (b) GCE/MIP após eletropolimerização, (c) GCE/MIP após extração de limoneno e (d) GCE/MIP após 15 minutos de religação em $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ solução de limoneno em LiClO_4 100 mmol L^{-1}	33
Figura 14. Espectro EDX para (a) GCE/NIP após extração, (b) GCE/MIP após extração de limoneno e (c) GCE/MIP após 15 minutos de religação em solução de limoneno $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em LiClO_4 100 mmol L^{-1}	34
Figura 15. Curvas analíticas para detecção de limoneno usando (a) sensor MIP e (b) NIP em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ após 15 minutos de religação em solução de	

limoneno (1,0 pmol a 10 nmol L ⁻¹ em LiClO ₄ 100 mmol L ⁻¹). Voltamogramas DPV correspondentes à curva analítica MIP são exibidos na imagem (c).....	36
Figura 16. Estudo de seletividade comparando respostas de corrente entre os sensores GCE/MIP e GCE/NIP para detecção de 10 pmol L ⁻¹ de limoneno e possíveis interferentes após 15 minutos de religação cada um em LiClO ₄ 100 mmol L ⁻¹	38
Figura 17. Medições de repetibilidade para detecções consecutivas de limoneno de 10 pmol L ⁻¹ usando o mesmo eletrodo (n = 20).....	40
Figura 18. Medições de reprodutibilidade para detecções de limoneno de 10 pmol L ⁻¹ usando três eletrodos diferentes.....	41
Figura 19. Método de adição de padrão a amostra de água amarela para determinação e quantificação de limoneno, ilustrando as (a) medidas de DPV e (b) curva analítica.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação da faixa linear e limite de detecção de alguns métodos relatados na literatura para determinação de limoneno.	37
Tabela 2. Fator de impressão (α) e fator de seletividade (β) para o sensor GCE/MIP e para o sensor GCE/NIP na presença de moléculas interferentes.....	39
Tabela 3. Determinação de limoneno em amostras de água amarela da indústria citrícola (n=3).	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Indústria da Laranja	10
1.1.1	<i>Características da Fruta</i>	11
1.1.2	<i>Resíduos Agroindustriais.....</i>	12
1.2	Limoneno	13
1.3	Métodos de determinação do Limoneno.....	14
1.4	Sensores eletroquímicos.....	15
2	OBJETIVOS	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1	Reagentes e Soluções	19
3.2	Equipamentos.....	19
3.3	Síntese e preparo do eletrodo modificado com MIP.....	20
3.4	Caracterização do GCE/MIP.....	21
3.5	Medidas eletroanalíticas.....	21
3.6	Estudos de seletividade, repetibilidade e estabilidade	22
3.7	Aplicação do sensor (GCE/MIP) em amostras de águas residuárias da indústria de laranja 22	
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Estudos preliminares para o desenvolvimento do sensor MIP	24
4.1.1	<i>Estudo do comportamento eletroquímico do limoneno</i>	24
4.1.2	<i>Estudo da eletropolimerização do pirrol.....</i>	25
4.1.3	<i>Estudo da extração da molécula molde.....</i>	26
4.2	Otimização dos parâmetros experimentais	28
4.3	Caracterização eletroquímica do eletrodo GCE/MIP.....	30
4.4	Caracterização morfológica do eletrodo GCE/MIP	32
4.5	Performance analítica do eletrodo GCE/MIP	35
4.6	Seletividade do eletrodo GCE/MIP	37
4.7	Estabilidade de armazenamento, repetibilidade e reprodutibilidade do eletrodo GCE/MIP	40
4.8	Determinação do limoneno em águas residuárias da indústria da laranja	41
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 Indústria da Laranja

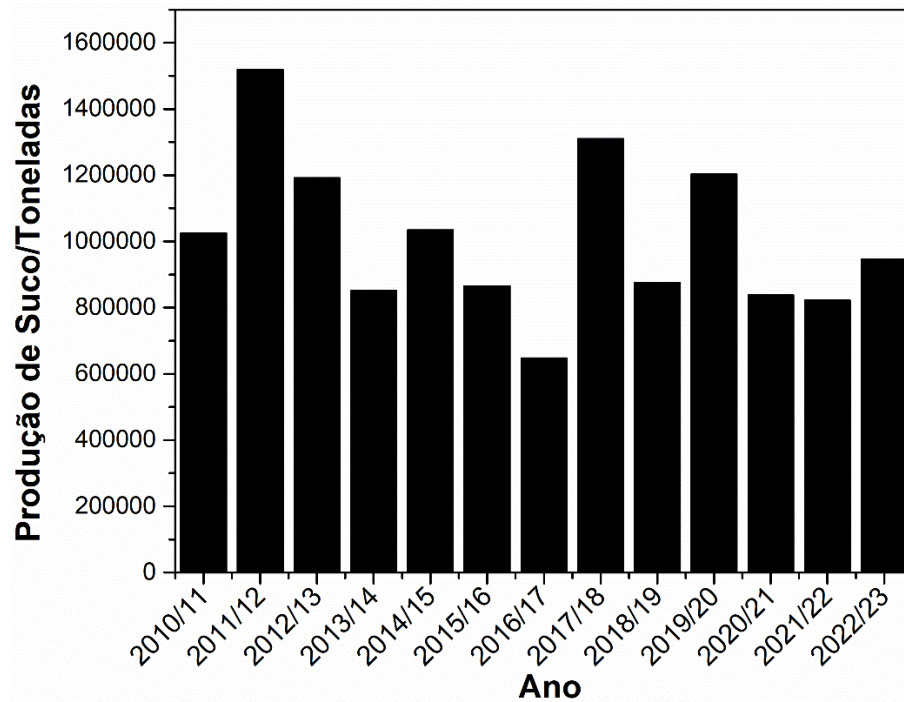
A agroindústria é um dos segmentos do agronegócio brasileiro mais próspero e lucrativo. De acordo com o comunicado técnico da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) e do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), a participação do setor no PIB total do país no ano de 2022 foi de 5,8% [1]. Entre os destaques da agroindústria, a indústria da laranja cada vez mais é evidenciada no país: maior produtor de laranja no mundo, o Brasil finalizou a safra 2022/23 em 314,21 milhões de caixas de 40,8 kg, 0,86% menor em comparação à projeção inicial publicada em maio de 2022 devido ao desequilíbrio no regime de chuvas nesse período [2].

Segundo CitrusBr, do total de laranjas produzidas na safra 2022/23, cerca de 265,29 milhões de caixas (84,4% do montante colhido) foram destinadas ao processamento industrial [3], setor dominado pela produção de suco. Nas últimas décadas, o Brasil se consolidou como o maior exportador de suco de laranja do mundo, e seus principais mercados são países localizados na Europa, seguido de parceiros comerciais como Estados Unidos, Japão, entre outros. A predominância brasileira na produção da fruta é visível, pois três em cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo são de origem brasileira [4].

Para ilustrar o expressivo mercado de suco de laranja, a Figura 1 apresenta a evolução da produção de suco concentrado congelado (FCOJ) da safra de 2010/11 até a safra de 2022/23. O Grau Brix corresponde à quantidade de sólidos solúveis presentes no suco. A escala é medida por meio de um refratômetro, com a determinação do número de gramas de açúcar contidos em 100 g de solução. Quanto maior o Grau Brix, maior a doçura e a qualidade do líquido. Ademais, outro tipo produzido e comercializado em menor escala corresponde ao suco de laranja não-concentrado congelado (NFC).

Ao considerar a relevância da indústria da laranja para o mercado econômico nacional, a qual é responsável pelo mantimento de cerca de 200 mil famílias brasileiras e por um forte impacto na economia das 350 cidades que estabelecem o cinturão citrícola entre os Estados de São Paulo e Minas Gerais [4], a análise de sua cadeia produtiva e de seus resíduos é indispensável para a identificação contínua de novas oportunidades financeiras e sustentáveis. Além disso, a identificação de matérias-primas reaproveitáveis, que resultem em subprodutos de alto valor comercial simultaneamente com a diminuição de desperdícios e impacto ambiental, é a premissa por trás do presente estudo.

Figura 1. Produção em Toneladas de Suco Concentrado Congelado (FCOJ Equivalente a 66° Brix).



Fonte: Adaptado de CitrusBR, 2023 [5].

1.1.1 Características da Fruta

Derivadas da laranjeira da espécie *Citrus × sinensis*, as laranjas doces são as principais matérias-primas nos preparos de sucos e de doces, bem como para consumo próprio. As principais variedades produzidas no Brasil incluem: precoces (Hamlin, Westin, Rubi, Valência Americana, Seleta, Pineapple), Pera Rio, que é a variedade de meia-estação, e as variedades tardias, como Valência, Valência Folha Murcha e Natal [6]. A diversidade dos pomares citrícolas é crucial para estratificar a colheita de laranja ao longo do ano, possibilitando para a indústria o prolongamento do período de processamento de frutos para a produção de suco, além de resultar em melhor manejo de pragas e redução dos impactos de adversidades climáticas [7].

A laranja é essencialmente composta por casca, polpa e bagaço, suco e sementes. Sua composição química influencia diretamente em fatores de qualidade como aroma, sabor, textura e cor. Popularmente conhecidas pela alta concentração de ácido ascórbico (vitamina C), as laranjas doces são igualmente fontes significativas de polifenóis e de limonoides, além de possuírem alta atividade antioxidante (flavonoides) [8]. Os principais flavonoides presentes na laranja pertencem aos grupos flavononas, flavonas, flavonóis, ácidos fenólicos e seus derivados

[9]. As frutas cítricas, no geral, são fontes ideais de ácido fólico, vitamina B, lipídeos (ácidos graxos), potássio, fósforo, cálcio, ferro, magnésio, nitrogênio, sódio e enxofre [10], [11].

Os carotenoides também são encontrados no albedo (mesocarpo) e na polpa da laranja [8], mas em quantidades menos significativas. O endocarpo é rico em açúcar solúvel (glicose, sacarose e frutose) e contém quantidades consideráveis de pectina, fibras, sal de potássio e ácidos orgânicos [10], [11]. O ácido cítrico é responsável pela maior parte da acidez titulável no suco da laranja (80-90%), que também contém malato (9-15%) e pequenas quantidades de succinato e isocitrato [12].

O principal componente extraído pela indústria é o óleo essencial, presente na casca da laranja, que consiste em uma mistura de diferentes compostos químicos voláteis. Essa extração ocorre mecanicamente através da prensagem das cascas, que é frequentemente combinada com a produção do suco da fruta. Os óleos essenciais de cítricos são conhecidos pelo alto teor de hidrocarbonetos terpenóides, além da presença, em menor quantidade, de compostos oxigenados de terpenóides, álcoois, aldeídos, ésteres e cetonas. Dentre os terpenos, os monoterpenos (C10) e os sesquiterpenos (C15) são os componentes predominantes, mas apenas alguns deles apresentam atividade aromática. O monoterpeno (+)-limoneno é o principal componente dos óleos de frutas cítricas (cerca de 90 a 95%), e é o elemento crucial na definição do sabor e do aroma do fruto [11], [12].

1.1.2 Resíduos Agroindustriais

O processamento industrial da laranja segue as etapas de recepção e limpeza da fruta, extração do suco, concentração do suco e obtenção do óleo essencial [13]. A maior fração da fruta corresponde ao suco. A cada 1000 kg de laranja são extraídos 553 kg de suco, 30 kg de polpa, 3 kg de óleo da casca e 414 kg de casca, bagaço e sementes [7]. Há descarte zero de resíduos sólidos da laranja no meio ambiente devido ao reaproveitamento de todas as partes da fruta [14].

Cerca de 7,5% da receita total do negócio com a fruta corresponde à comercialização dos subprodutos [15]. A água residual do processo, já mencionada anteriormente como água amarela, é um efluente líquido rico em subprodutos de alto valor agregado, tais como óleos essenciais, pectina, flavonoides e terpenos [16], que podem se tornar um problema ambiental se descartados em recursos hídricos por consistirem em material de alto teor orgânico. Como explicado por Viuda-Martos *et al.* (2011) [17], narirutina, naringina e hesperidina foram os compostos flavonoides mais concentrados encontrados na água amarela, enquanto os principais

açúcares solúveis detectados foram glicose, frutose e sacarose. Os principais ácidos orgânicos identificados foram os ácidos acético, ascórbico, cítrico, málico, oxálico e succínico.

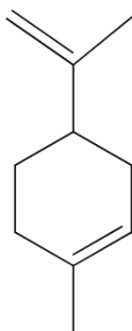
Os carotenoides e os ácidos hidroxicinâmicos também são reconhecidos nos resíduos. O terpeno mais proeminente na água amarela é o D-limoneno [18]. Dentre os subprodutos comercializados pela indústria da laranja, o D-limoneno possui uma fatia de mercado expressiva o suficiente [7] para qualificar os efluentes líquidos da indústria de processamento de suco de laranja como uma fonte interessante para sua recuperação e reaproveitamento.

A valorização da água amarela como fonte de moléculas reutilizáveis é vantajosa, tanto do ponto de vista ambiental, como econômico. Assim, os métodos de determinação desenvolvidos estritamente para detecção e seleção do D-limoneno são ferramentas vitais para alcançar uma recuperação eficiente desta molécula de grande relevância.

1.2 Limoneno

Principal composto químico da fração oleosa de óleos essenciais cítricos, o limoneno, ou 1-metil-4-(1-metiletenil)ciclohexeno, é classificado como um terpeno monocíclico. Na natureza, os terpenos estão presentes em organismos do reino *Plantae* e exercem o papel de metabólitos secundários [19]. Essas plantas são ricas em isômeros de limoneno (Figura 2), D-limoneno e L-limoneno, encontrados em diferentes quantidades e proporções [20].

Figura 2. Estrutura molecular do limoneno.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O limoneno é internacionalmente reconhecido por sua baixa toxicidade, além de ser compreendido como um produto seguro para aplicações na indústria alimentícia – como um agente flavorizante em produtos –, tais como sucos de frutas, refrigerantes e sorvetes, e na indústria cosmética, como fragrância em perfumes e sabonetes [21].

Além da segurança no uso, aplicações medicinais têm sido desenvolvidas com o próprio limoneno, como, por exemplo, no tratamento de cálculos renais [22]. Pode-se destacar também outra aplicação em grande evidência atualmente: o uso do limoneno como biosolvente “verde”. A classificação “verde” é estampada devido à natureza da substância, que caracteriza uma alternativa de baixo impacto ambiental e toxicidade em relação a solventes tradicionais da indústria química [23].

A separação do D-limoneno do óleo essencial obtido da casca da laranja é realizada em grande parte devido a sua baixa solubilidade em água, alta tendência à auto-oxidação e polimerização, tornando-se um subproduto industrial adequado para bioconversões a compostos de alto valor comercial [23].

1.3 Métodos de determinação do Limoneno

Até o presente momento, os trabalhos encontrados na literatura para determinação de limoneno em diferentes matrizes utilizam em geral cromatografia gasosa (GC, *gass chromatography*) com detectores de espectrometria de massas (MS, *mass spectrometry*) [24], [25], ionização de chama (FI, *flame ionization*) [26] e com sensores de óxidos metálicos [27]. Os limites de detecções alcançados por estas técnicas são baixos, no entanto, estes métodos são caros, exigindo equipes experientes para operá-los, pois os analitos precisam ser voláteis, o tempo de análise é longo, há alto consumo de fase móvel (gases de arraste: hidrogênio, nitrogênio, hélio e argônio), além das etapas adicionais necessárias para preparo da amostra.

O limoneno também pode ser determinado por técnicas eletroanalíticas [28]-[35]. A aplicação dessas técnicas geralmente possui um menor custo em comparação as técnicas cromatográficas. Apresenta, também, a possibilidade de desenvolver dispositivos portáteis, no caso das técnicas voltamétricas, o que pode proporcionar grande praticidade à análise química. Os baixos limites de detecção (LOD) estão associados a estas técnicas, podendo chegar à grandeza de 10^{-10} mol L⁻¹ [28].

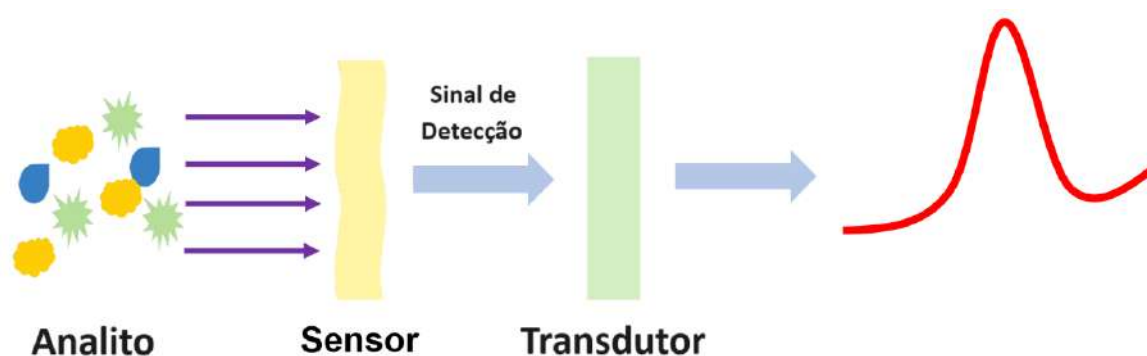
Embora as técnicas eletroquímicas apresentem métodos com os menores limites de detecção, poucos estudos têm relatado seu uso para a determinação do limoneno. Os sensores eletroquímicos baseados em microbalança eletroquímica a cristal de quartzo (EQCM, *electrochemical quartz crystal microbalance*) foram desenvolvidos para determinação de limoneno na fase gasosa, em razão da sua elevada volatilidade [29]-[35]. Estes sensores apresentam baixos LOD, na casa das partes por milhão (ppm) [30], [35].

Os sensores eletroquímicos baseados em eletrodos sólidos para a determinação de limoneno em fase aquosa não têm sido relatados na literatura. Portanto, a detecção simples e rápida destes analitos com alta sensibilidade e livre de interferentes utilizando sensores eletroquímicos é de grande interesse industrial.

1.4 Sensores eletroquímicos

Um sensor é um dispositivo responsável por detectar, com eficiência, algumas entradas provenientes de um ambiente físico, tais como luz, calor, movimento ou qualquer outra variável detectável que possa constituir um exemplo de entrada. Após receber uma determinada entrada do ambiente, o sensor emite uma saída, que geralmente é um sinal capaz de ser convertido e interpretado por outros dispositivos como, por exemplo, processadores de dados [36].

Figura 3. Esquema ilustrativo da aplicação de um sensor eletroquímico.



Fonte: Adaptado de Fu *et al.* (2021) [37].

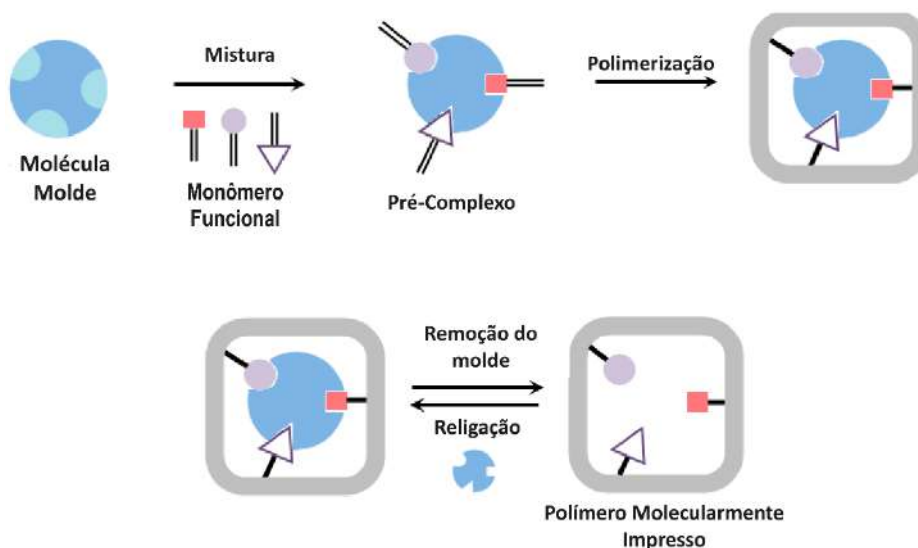
As matrizes de sensores podem ser projetadas considerando dois aspectos: primeiro, os materiais de detecção precisam ser de baixo custo, fáceis de sintetizar, estáveis, altamente sensíveis e seletivos. Em segundo lugar, os elementos do transdutor devem ser sensíveis às pequenas variações de concentração do analito, portáteis e rápidos em resposta [33]. Entre a grande diversidade de sensores eletroquímicos existentes, destacam-se os sensores eletroquímicos baseados em polímeros molecularmente impressos (MIPs, *molecularly imprinted polymers*). Os MIPs apresentam pequenos LOD, ampla faixa linear e elevada seletividade.

A impressão molecular surgiu a partir de mecanismos de reconhecimento molecular que atuam de forma semelhante ao sistema antígeno-anticorpo [38]. A síntese dos MIPs consiste, inicialmente, na interação da molécula de interesse com a molécula do monômero.

Posteriormente, ocorre a formação de uma matriz polimérica contendo o molde (analito). Através do uso de solventes apropriados, ou empregando eletroquímica, ocorre a extração da molécula molde, formando no polímero o *template*, ou seja, a formação de uma cavidade específica da molécula de interesse [39]. Estas cavidades são constituídas por sítios específicos de ligação, que agem no reconhecimento deste composto, ou de substâncias com estrutura semelhante aos sítios de ligação.

Vários procedimentos são utilizados para preparação de filmes poliméricos diretamente na superfície do transdutor, incluindo: a) eletropolimerização de um monômero funcional eletroativo, b) repouso em solução do polímero pré-preparada, c) preparação de compósitos de membranas contendo um material condutor (por exemplo, nanotubos de carbono e grafeno) e um ligante (por exemplo, policloreto de polivinila), e d) polimerização química *in situ* de um complexo de monômero funcional, e um molde em solução, que é depositado para formar uma película fina. Ao comparar esses procedimentos de preparação, os MIPs preparados por eletropolimerização têm propriedades superiores, simplicidade e menor tempo de preparação no que diz respeito a aderência à superfície do transdutor. Além disso, a eletropolimerização permite um fácil controle da espessura e morfologia do polímero eletrodepositado, bem como alta reprodutibilidade sem necessidade de controle rigoroso de temperatura [40].

Figura 4. Esquema ilustrativo da construção de um polímero molecularmente impresso (MIP).



Fonte: Adaptado de Saylan *et al.* (2019) [41].

Os sensores eletroquímicos baseados em MIPs sobre EQCM foram desenvolvidos para detecção de limoneno [29], [31], [32]. Até o presente momento, nenhum sensor eletroquímico

baseado em eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos via eletroquímica foi reportado na literatura para determinação de limoneno em águas residuais da indústria de laranja. Portanto, o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos, principalmente os que utilizam sensores eletroquímicos, têm recebido bastante atenção nos últimos anos, visto que esses dispositivos têm se tornado cada vez mais precisos, sensíveis e seletivos, além de seu baixo custo, portabilidade, facilidade de automação e possibilidade de miniaturização. Ademais, a detecção simples e rápida destes analitos com alta sensibilidade e livre de interferentes utilizando sensores eletroquímicos é benéfico para a atividade industrial e, portanto, alvo de interesse dos empresários do ramo.

2 OBJETIVOS

Levando em conta a importância econômica do limoneno e a possibilidade de seu reaproveitamento a partir da água amarela, rejeito da indústria do processamento da laranja, o presente trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de um novo método para determinação de limoneno através da construção de um sensor eletroquímico baseado em eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos.

Os objetivos específicos deste projeto, incluem:

- Estudar os parâmetros experimentais que influenciam a forma e a estrutura do filme do MIP;
- Realizar a otimização de parâmetros experimentais para encontrar as condições que resultem na construção de maior eficiência do sensor;
- Caracterizar os eletrodos modificados utilizando técnicas eletroquímicas, microscópicas e espectroscópicas;
- Estudar as figuras de mérito que representam a performance analítica do sensor GCE/MIP;
- Examinar a seletividade, a estabilidade, a repetibilidade e a reprodutibilidade do sensor GCE/MIP;
- Aplicar o sensor GCE/MIP em águas residuárias da indústria da laranja para a validar o método analítico para a detecção de limoneno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nessa seção são descritos os reagentes, as soluções e os equipamentos utilizados para a realização do trabalho, bem como as metodologias empregadas na síntese dos eletrodos modificados, na execução dos estudos eletroquímicos e eletroanalíticos, na caracterização e no desenvolvimento do sensor.

3.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes limoneno (pureza: ~90,0%), hidróxido de sódio (pureza: $\geq 98,0\%$), perclorato de lítio (pureza: 99,9%), pirrol (pureza: 98,0%), glicose (pureza: $\geq 99,5\%$), sacarose (pureza: $\geq 99,5\%$), frutose (pureza: $\geq 99,0\%$), hesperidina (pureza: $\geq 80,0\%$) e naringina (pureza: $\geq 90,0\%$) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O ácido cítrico (pureza: $\geq 99,5\%$) foi comprado da Synth. O ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$, pureza: 99,0%) foi fornecido pela Qhemis. O cloreto de potássio (pureza: $\geq 99,9\%$) e o ácido nítrico (pureza: $\geq 65,0\%$) foram obtidos da Neon. O solvente acetonitrila (pureza: $\geq 99,8\%$) foi comprado da Merck.

Uma solução estoque de 100 mmol L⁻¹ de limoneno foi preparada por diluição em acetonitrila. Uma solução aquosa de perclorato de lítio 100 mmol L⁻¹ foi empregada como eletrólito de suporte. Todas as soluções preparadas em meio aquoso foram elaboradas com água ultrapura com resistividade $\geq 18 M\Omega$ cm a 25°C (sistema de purificação Milli-Q).

3.2 Equipamentos

Os estudos eletroquímicos foram conduzidos em um potenciostato/galvanostato PalmSens3 (PalmSens®) conectado com o *software* PSTrace 4.8.5. As análises de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, *electrochemical impedance spectroscopy*) foram realizadas através do módulo FRA de um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT-204 (Metrohm) controlado pelo *software* NOVA 1.11. Para a realização de todos os procedimentos, foi empregada uma célula eletroquímica convencional de 25 mL composta por três eletrodos: eletrodo auxiliar de fio de platina, eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e eletrodo de trabalho de carbono vítreo (GCE, *glass carbon electrode*, área geométrica: 0,031 cm²) modificado com MIP de polipirrol (PPy, *polypyrrole*). Todas as

experiências foram realizadas com medições em triplicata à temperatura ambiente (25 °C). Para as análises de dados e plotagem de figuras foram utilizados os softwares Microsoft Office Excel 2019 e OriginPro 9.0.

Figura 5. Imagem ilustrativa do potenciostato/galvanostato PalmSens®.



Fonte: PalmSens, 2016.

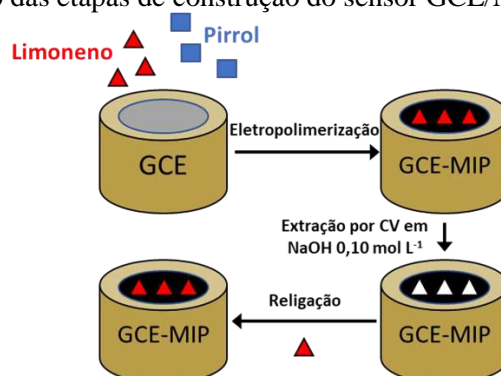
3.3 Síntese e preparo do eletrodo modificado com MIP

Inicialmente, o GCE foi imerso em HNO_3 (20 % w/w) e submetido a varreduras sucessivas utilizando a técnica de voltametria cíclica (CV, *cyclic voltammetry*) no intervalo de potencial entre -1,0 a 2,0 V de modo a remover quaisquer impurezas metálicas da superfície do eletrodo. Em seguida, a superfície do GCE foi polida em um feltro contendo α -alumina (0,30 μm). Imediatamente, o eletrodo foi lavado abundantemente com água ultrapura.

A solução contendo o monômero (Py) e a molécula molde (limoneno) foi preparada em LiClO_4 100 mmol L^{-1} . Esta solução foi mantida sob agitação lenta pelo período de 2 horas para interação do sistema. Após o período de interação, a eletropolimerização foi executada sobre a superfície do GCE por meio da CV no intervalo de potencial entre 0,0 e 1,0 V *vs.* Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}) sob velocidade de varredura (v) de 50 mV s^{-1} .

Posterior à eletropolimerização, o eletrodo modificado foi imbuído em 10 mL de NaOH 100 mmol L^{-1} e submetido a voltamogramas cíclicos sucessivos no intervalo de potencial entre 0,0 e 1,8 V, sob v de 50 mV s^{-1} para remoção do analito dos sítios de ligação. Todas as etapas de modificação do eletrodo GCE estão ilustradas na **Figura 6**.

Figura 6. Esquema ilustrativo das etapas de construção do sensor GCE/MIP.



Fonte: elaborada pela autora.

As concentrações de pirrol e limoneno, o número de ciclos da polimerização e da extração e o tempo de religação da molécula molde foram otimizados. Como forma de controle e verificação da seletividade do MIP, realizou-se a sintetização de polímeros não impressos (NIPs) a partir da execução dos mesmos procedimentos descritos para o preparo do GCE/MIP, porém com a ausência da molécula de interesse no processo de polimerização.

3.4 Caracterização do GCE/MIP

A caracterização eletroquímica do eletrodo foi realizada utilizando CV e EIS. Os experimentos CV foram realizados na faixa de potencial de -0,20 a 0,80 V a 50 mV s^{-1} . A análise EIS foi realizada utilizando um potencial fixo de 0,22 V e uma faixa de frequência de 0,10 Hz a 100 kHz. Uma solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi usada como sonda redox para as medições de CV e EIS.

Com o intuito de examinar as características espectroscópicas do eletrodo modificado, foi empregado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (SEM-FEG) da marca Jeol, modelo JSM 7500F. As modificações examinadas foram preparadas em placas de carbono vítreo (GC) com área geométrica de $0,071 \text{ cm}^2$.

3.5 Medidas eletroanalíticas

Nesta etapa, o teste de detecção da molécula molde em 10 mL de solução de incubação contendo limoneno foi realizado com o objetivo de verificar se o analito foi removido no processo de extração. Neste experimento, a molécula molde foi incubada na matriz polimérica

em meio de LiClO_4 100 mol L^{-1} contendo limoneno 430 mmol L^{-1} , agitando lentamente por um tempo. Este tempo de religação foi estudado no decorrer do trabalho.

A resposta da corrente do eletrodo foi monitorada pela técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV, *differential pulse voltammetry*) para melhor visualizar as respostas de corrente elétrica do sensor, empregando a sonda eletroquímica $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na faixa de potencial de $-0,20$ a $0,80 \text{ V}$, utilizando taxa de varredura de $8,0 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de $4,0 \text{ mV}$ e pulso tempo de $0,25 \text{ s}$. As figuras de mérito, incluindo sensibilidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram obtidas por análise da curva analítica. LOD e LOQ foram calculados pelas seguintes equações: $\text{LOD} = \frac{3S}{m}$ and $\text{LOQ} = \frac{10S}{m}$, no qual S é a inclinação da curva analítica, e m é o desvio padrão residual da curva analítica ($n = 3$) [42].

3.6 Estudos de seletividade, repetibilidade e estabilidade

A seletividade do sensor MIP foi examinada pelo emprego de moléculas que possuem tamanhos e grupos análogos ao limoneno encontrado em resíduos industriais do processamento de suco de laranja (glicose, frutose, sacarose, hesperidina, naringina e ácido cítrico) através de medições de DPV. As soluções foram preparadas com água ultrapura na concentração de 10 pmol L^{-1} . O sensor NIP também foi incluído no estudo de comparação.

Para o estudo de repetibilidade, foram realizadas 20 repetições sequenciais da medição do DPV com a sonda redox após a religação da molécula molde com uma solução de incubação de 100 mmol L^{-1} de LiClO_4 contendo 10 pmol L^{-1} de limoneno. Considerando a reprodutibilidade do sensor, foram produzidos três diferentes eletrodos GCE/MIP para análise do desempenho do DPV da solução de incubação de 10 pmol L^{-1} de limoneno. Uma solução com a mesma composição foi utilizada para avaliar a estabilidade do sensor MIP repetindo a medição do DPV com sonda redox após a etapa de religação, em intervalos de 3, 6, 19 e 26 dias.

3.7 Aplicação do sensor (GCE/MIP) em amostras de águas residuárias da indústria de laranja

As amostras de águas residuárias foram coletadas em efluentes de uma indústria de sucos na região de Matão (Estado de São Paulo, Brasil). Todas as amostras foram filtradas com filtro de porosidade de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e, em seguida, alíquotas de $25 \text{ }\mu\text{L}$ foram diluídas em 10 mL de

água ultrapura para preparo de solução estoque. Na sequência, alíquotas de 10 μL da solução estoque foram diluídas em 10 mL de solução eletrolítica. As adições cumulativas de 2,5 pmol L^{-1} de limoneno foram realizadas posteriormente. A determinação do limoneno foi realizada pelo método de adição padrão. As medidas de DPV foram realizadas indiretamente através da sonda redox $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. A validação dos resultados foi executada por ensaios de recuperação, em que concentrações conhecidas de limoneno foram adicionadas às amostras de águas residuárias de laranja.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção apresenta os resultados obtidos para as metodologias e procedimentos propostos na Seção 3. Dentre as discussões levantadas, incluem-se: os estudos preliminares para o desenvolvimento do MIP, a otimização do sensor GCE/MIP, a caracterização eletroquímica e morfológica do eletrodo modificado, o desempenho analítico do sensor, estudos de performance analítica, seletividade, estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade, finalmente com a aplicação do sensor modificado para detecção de limoneno em amostras reais.

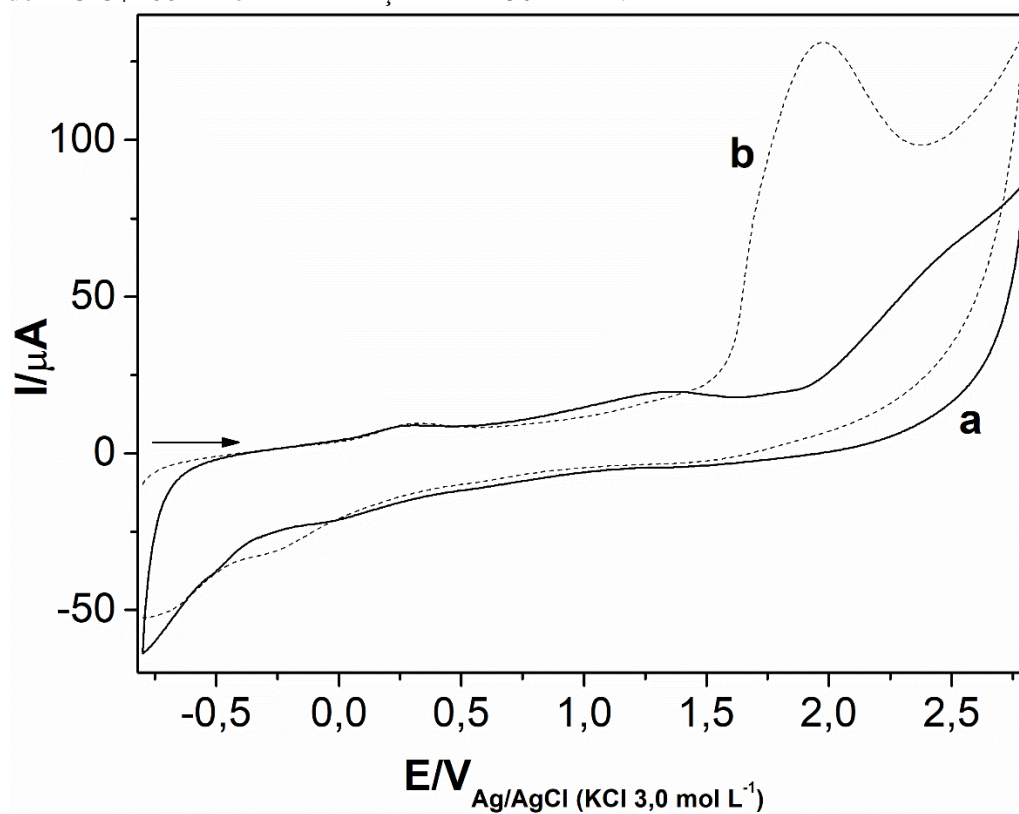
4.1 Estudos preliminares para o desenvolvimento do sensor MIP

A formação do filme impresso sobre a superfície do GCE influencia diretamente na sensibilidade do sensor desenvolvido, portanto, os parâmetros experimentais da formação do filme foram estudados.

4.1.1 Estudo do comportamento eletroquímico do limoneno

O estudo do comportamento eletroquímico de limoneno foi realizado sobre a superfície do GCE em solução de acetonitrila contendo LiClO_4 100 mmol L^{-1} na presença e ausência de limoneno $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 7 apresenta o CV obtido no intervalo de potencial entre $-0,80$ e $2,8 \text{ V}$ com v de 50 mV s^{-1} . Na ausência de limoneno, não foram observados picos de oxidação ou redução (Figura 7, curva a). No entanto, um pico anódico (PA) foi identificado na presença do analito (Figura 7, curva b), indicando que ocorre oxidação do limoneno na superfície do eletrodo dentro da janela de potencial analisada. Além disso, na região catódica, nenhum sinal foi observado, o que significa que não ocorre a redução dele dentro do intervalo de potencial estudado. O PA do limoneno obtido na superfície do GCE apresentou potencial de oxidação de $1,96 \text{ V}$ com corrente de PA (IPA) de $100,4 \mu\text{A}$, Figura 12 (curva b).

Figura 7. CVs na ausência (a) e presença (b) de limoneno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solução de acetonitrila contendo LiClO_4 100 mmol L^{-1} . Condições: v de 50 mV s^{-1} .



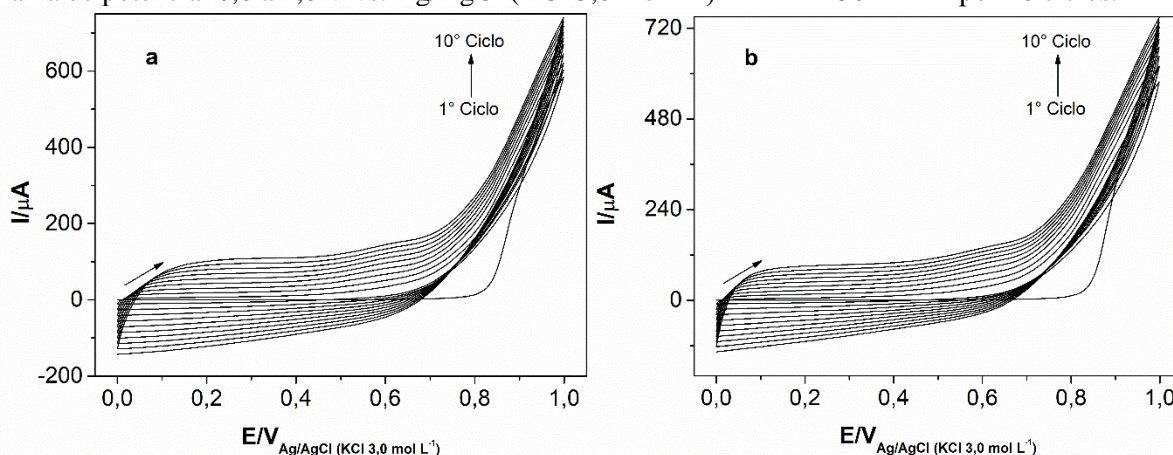
Fonte: elaborada pela autora.

4.1.2 Estudo da eletropolimerização do pirrol

O polímero de pirrol (PPy) foi escolhido como o monômero funcional para a síntese eletroquímica do sensor MIP devido à sua extensa aplicação como polímero para impressão molecular em sensores eletroquímicos. Ele se destaca por ser capaz de formar filmes finos e compactos, necessários para a diminuição do tempo de resposta do sensor, além de apresentar alta estabilidade térmica e eletrodeposição homogênea. Outra vantagem associada ao PPy é a sua capacidade de incorporar ânions na sua estrutura durante a polimerização, o que facilita a impressão de moléculas orgânicas [43].

A Figura 8 demonstra os CVs obtido na eletropolimerização do pirrol na faixa de potencial de 0,0 a 1,0 V com v de 50 mV s^{-1} por 10 ciclos sucessivos. O processo de polimerização eletroquímica para construção do MIP foi realizado em meio LiClO_4 100 mmol L^{-1} contendo 25 mmol L^{-1} de pirrol e 100 mmol L^{-1} de limoneno.

Figura 8. CVs de eletropolimerização de pirrol na superfície do GCE para (a) MIP e (b) NIP. Condições: faixa de potencial 0,0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) com v de 50 mV s⁻¹ por 10 ciclos.



Fonte: elaborada pela autora.

A polimerização do pirrol na superfície do GCE não produz picos anódicos e catódicos em ambos os sensores, MIP e NIP, sendo este último também analisado para fins de comparação como mostra a Figura 8. À medida que o filme cresce, a formação do filme PPy é observada por causa do aumento da intensidade da corrente, graças à formação do cátion radical no potencial de 0,15 V. Durante este processo, no caso do sensor MIP, as moléculas de limoneno são atraídas para as unidades de pirrol em função das interações de hidrogênio entre o hidrogênio do grupo metil do limoneno e o átomo de nitrogênio do grupo NH das unidades de pirrol [44]. Essa interação entre as moléculas permite o aprisionamento do limoneno na matriz polimérica, criando um arranjo tridimensional ao conter a molécula de interesse.

A ausência de diferença significativa entre a eletropolimerização na presença e na ausência de moléculas de limoneno é atribuída ao fato de a eletropolimerização do limoneno ocorrer através de um mecanismo radical, em vez de um processo redox. Hidrocarbonetos, como o limoneno, não são tipicamente redox-ativos porque carecem de grupos funcionais ou elementos que participem prontamente nas reações de transferência de elétrons [45]. Portanto, a análise do processo está relacionada ao aumento da corrente associada ao crescimento progressivo do filme PPy na superfície do eletrodo.

4.1.3 Estudo da extração da molécula molde

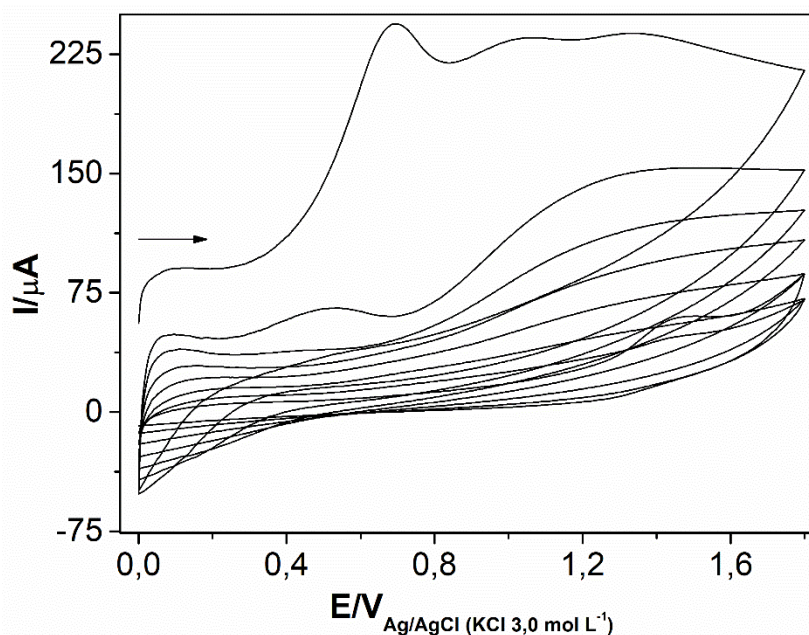
Após a formação do filme polimérico na superfície do GCE, a molécula molde foi removida da cadeia polimérica. Usualmente, nesta etapa é utilizado um solvente extrator, que é responsável pela geração de sítios de ligação com o tamanho e formato do analito removido,

produzindo uma memória molecular no polímero, de forma que a etapa de religação da molécula seja seletiva [46]. No entanto, neste trabalho, os sítios de ligação seletiva do limoneno foram formados através da superoxidação do PPy.

O PPy é superoxidado em potenciais positivos, o que geralmente é indesejado. Isso porque a superoxidação resulta em uma degradação do polímero, o que resulta na perda de condutividade. Apesar desta desvantagem, o PPy é amplamente utilizado em aplicações eletroanalíticas [47]. A versatilidade na síntese do PPy, sua polimerização direta sem necessidade de extração química e o amplo controle disponível sobre suas propriedades contribuem para que sua aplicação na construção de MIPs seja altamente benéfica.

A extração eletroquímica foi realizada pela técnica de CV com o GCE modificado submerso em 10 mL de NaOH 100 mmol L⁻¹ aplicando a faixa de potencial de 0,0 a 0,8 V por 8 ciclos sucessivos com v de 50 mV s⁻¹ [43]. A Figura 9 mostra os CVs resultantes da extração eletroquímica do limoneno da cadeia polimérica.

Figura 9. CVs da extração de limoneno por superoxidação de PPy em solução de NaOH 100 mmol L⁻¹. Condições: $v = 50$ mV s⁻¹ e 8 ciclos sucessivos.



Fonte: elaborada pela autora.

Um pico anódico de aproximadamente 0,69 V pode ser observado no primeiro CV, que representa a superoxidação do PPy (Figura 9). O processo de oxidação desencadeia a quebra da cadeia polimérica e, conseqüentemente, a remoção do limoneno da matriz polimérica, formando, assim, os sítios de reconhecimento. A superoxidação anódica do PPy é geralmente

realizada na presença de nucleófilos, nos quais os cátions radicais do polímero sofrem oxidação irreversível em altos potenciais anódicos [47]. Além disso, uma diminuição na corrente de pico pode ser observada nos ciclos subsequentes de superoxidação do PPy, devido à perda de condutividade do filme (Figura 9).

4.2 Otimização dos parâmetros experimentais

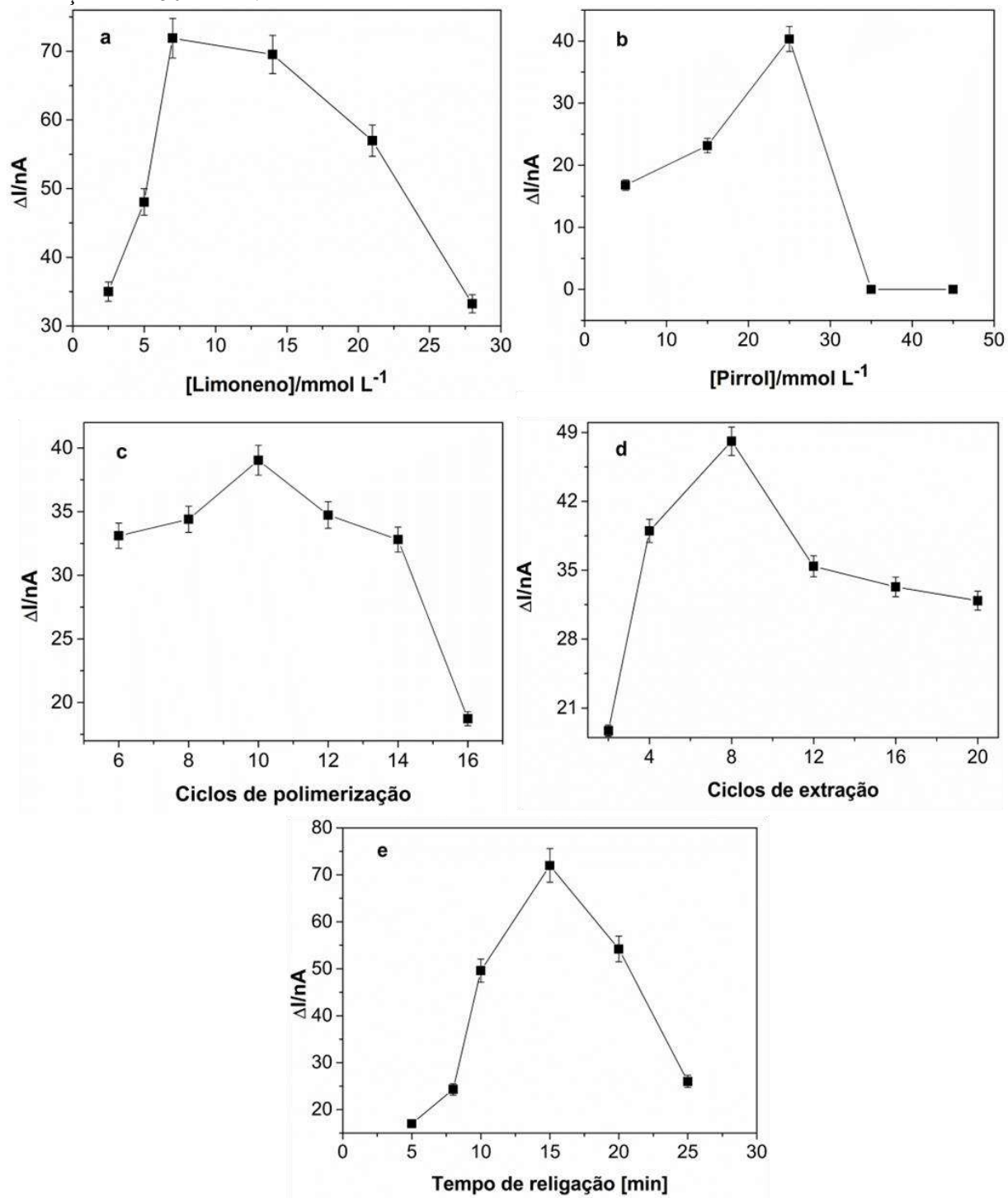
As otimizações do sensor MIP foram realizadas utilizando a sonda redox $K_3[Fe(CN)_6]$ na faixa de potencial de -0,20 a 0,80 V em v de 50 mV s^{-1} , utilizando as técnicas CV e DPV (condições: v de $8,0 \text{ mV s}^{-1}$, tempo de pulso de 0,25 s e amplitude do potencial de pulso de 4,0 mV). A variação da corrente de pico (ΔI), na oxidação da sonda redox, antes e após a religação da molécula de limoneno nas cavidades formadas, foi utilizada como sinal analítico na avaliação das melhores condições para cada parâmetro estudado.

Os parâmetros estudados no desenvolvimento do sensor foram: concentrações de limoneno (2,5 a 28 mmol L^{-1}) e pirrol (5,0 a 45 mmol L^{-1}), número de ciclos de polimerização (6 a 16 ciclos) e remoção da molécula molde (2 a 20 ciclos) e tempo de incubação (5 a 25 min). Os parâmetros listados influenciam diretamente no tamanho, características morfológicas, espessura e sensibilidade do sensor MIP [43]. Os resultados obtidos na otimização destes parâmetros estão apresentados na Figura 10.

A concentração da molécula de limoneno afeta a quantidade de cavidades de reconhecimento disponíveis para detecção. Concentrações de limoneno acima de $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ levam à diminuição da corrente de pico, provavelmente devido à formação de cavidades maiores, que estão repletas de aglomerados de limoneno, levando a menor seletividade do eletrodo (Figura 10a). A concentração de pirrol na solução de polimerização do sensor está relacionada à espessura e sensibilidade do filme. No estudo mostrado na Figura 10b, é evidenciado que acima de 25 mmol L^{-1} de pirrol a superfície do GCE fica saturada devido ao aumento da espessura do filme polimérico, o que conseqüentemente diminui a sensibilidade do GCE/MIP.

O número de ciclos de eletropolimerização também está relacionado com a espessura resultante do filme polimérico e sua conseqüente sensibilidade (Figura 10c). Até 8 ciclos, há um desempenho significativo, mas não otimizado, provavelmente devido à menor cobertura superficial pelo polímero, formando menos cavidades (Figura 10c). Acima de 12 ciclos, a espessura do filme aumenta, o que gera um obstáculo maior para a sonda redox atingir a superfície do eletrodo, dificultando a transferência eletrônica.

Figura 10. Efeito das concentrações de limoneno (a) e pirrol (b) utilizadas na eletropolimerização, número de ciclos de polimerização (c) e extração (d) e tempo de religação do limoneno (e), $n = 3$. Condições: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: elaborada pela autora.

O número de ciclos de extração influencia a melhoria ou deterioração da seletividade do filme, criando cavidades complementares ou perturbando o polímero. O sinal analítico cresceu rapidamente com o aumento dos ciclos de extração, indicando a formação de cavidades

através das quais a sonda redox conseguiu atingir a superfície do eletrodo (Figura 10d). Depois de atingir um desempenho máximo em 8 ciclos, observa-se um declínio progressivo com o aumento dos ciclos. Isto pode ser atribuído à ruptura da matriz polimérica devido à sua exposição ao solvente por ciclos adicionais. Essa ruptura acontece porque o ambiente básico facilita as quebras de ligações químicas que fazem parte da estrutura do filme polimérico [47]. O tempo de religação está relacionado ao período necessário para o preenchimento completo dos sítios vagos pelas moléculas de interesse. A intensidade da resposta do sensor atinge o seu máximo aos 15 minutos: isso indica que um tempo de exposição mais longo perturba o equilíbrio químico (Figura 10e). Depois desses 15 minutos, a difusão da molécula para os sítios vagos foi completada e uma exposição prolongada à solução de religação se provou prejudicial à integridade do filme polimérico, como indicado pela queda no sinal de resposta do sensor.

Portanto, as melhores condições para eletrodeposição de MIP na superfície do GCE foram limoneno $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pirrol 25 mmol L^{-1} , 10 ciclos de eletropolimerização, 8 ciclos de extração e 15 minutos de tempo de religação.

4.3 Caracterização eletroquímica do eletrodo GCE/MIP

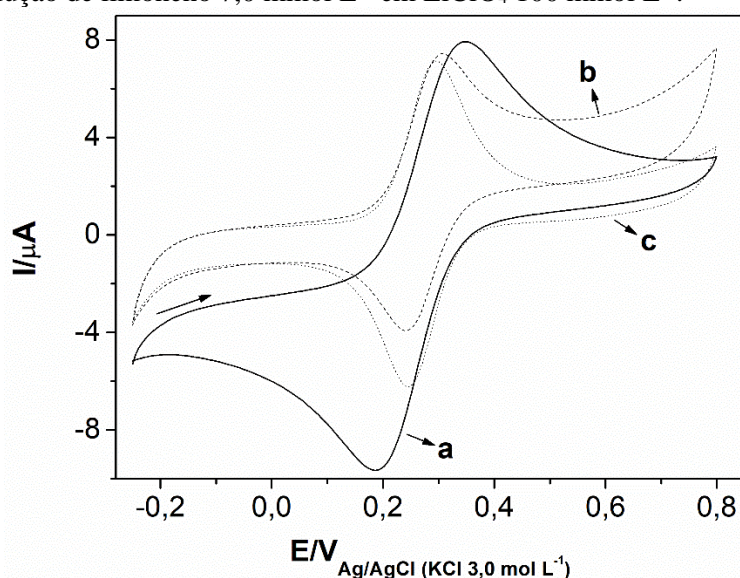
Após a otimização dos parâmetros experimentais, a caracterização eletroquímica do sensor foi estudada considerando as diferentes etapas de modificação do sensor MIP. CV foi utilizado para monitorar as variações de corrente de pico de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ aplicado como sonda redox na faixa de potencial de $-0,20$ a $0,80 \text{ V}$ em v de 50 mV s^{-1} . Os CVs resultantes são mostrados na Figura 11.

A necessidade de se usar $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ como sonda redox para monitorar o processo de religação da molécula é dada pelo fato de que o limoneno não oxida e não reduz dentro da faixa de potencial estudada e nem em meio aquoso (ver Figura 7). Portanto, existe a necessidade de obter o sinal analítico por um método indireto. A escolha do $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ se deve ao fato do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ possuir boa estabilidade eletroquímica e por garantir resultados analíticos confiáveis [47], além de ter baixo custo e ser acessível.

Após a eletropolimerização de MIP e NIP (Figura 8a-b), há uma diminuição na magnitude das correntes de pico redox em comparação com o GCE sem modificação (Figura 11a). Estes resultados comprovam a baixa condução elétrica do limoneno, que é eletrodepositado na superfície do eletrodo junto com o polímero. Além disso, pode-se observar alta resistência na transferência de elétrons devido à formação do filme PPy.

Observa-se um aumento na intensidade dos IPAs em consequência da extração da molécula molde de dentro da cadeia polimérica (Figura 11b). Este resultado indica que as ligações entre o analito e a cadeia polimérica foram quebradas. Portanto, houve a liberação de cavidades formadas no sensor. Esses locais de reconhecimento, quando livres, permitem a passagem da sonda redox que atinge a superfície eletroativa do sensor. No entanto, quando o limoneno foi religado (Figura 11c), o sinal analítico foi reduzido devido ao preenchimento parcial dos sítios de ligação.

Figura 11. CVs de (a) GCE, (b) GCE/MIP após extração com limoneno e (c) GCE/MIP após 15 minutos de religação em solução de limoneno $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em LiClO_4 100 mmol L^{-1} .



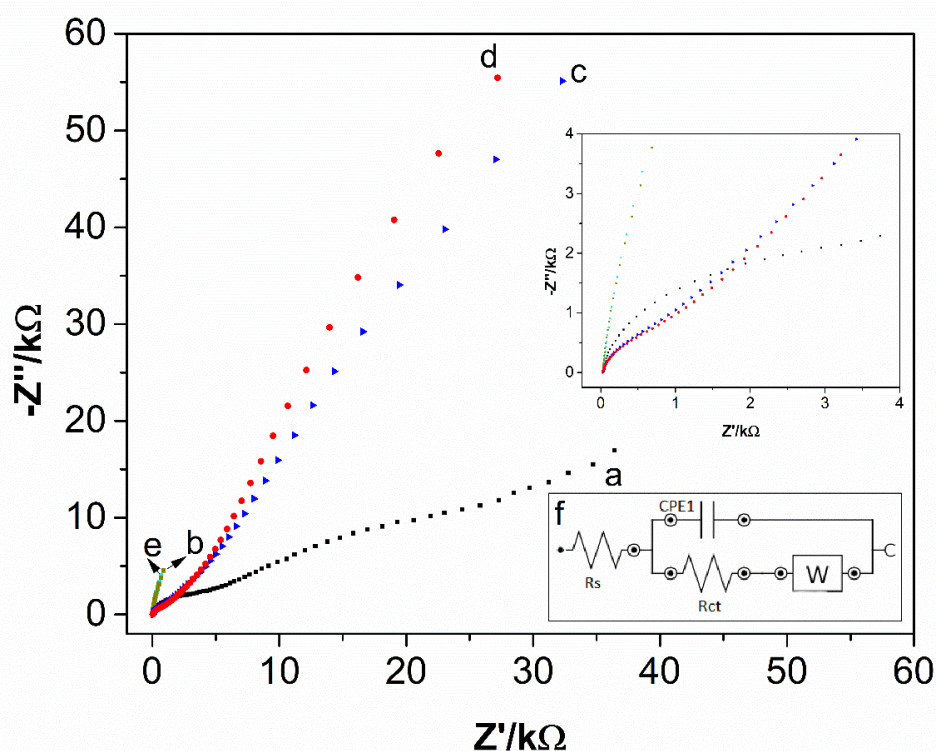
Fonte: elaborada pela autora.

O sensor GCE/MIP desenvolvido também foi analisado eletroquimicamente pela técnica de EIS. Os resultados foram avaliados por meio de diagramas de Nyquist (Figura 12). Este diagrama é caracterizado por possuir uma região semicircular em baixas frequências que está relacionada à resistência à transferência de carga (R_{ct}), e uma região linear em altas frequências que está relacionada à difusão. O estudo foi realizado utilizando potencial fixo de $0,22 \text{ V}$ e faixa de frequência de $0,10 \text{ Hz}$ a 100 kHz . O circuito equivalente simulado para os eletrodos não modificados e modificados inclui uma resistência de solução (R_s), um resistor de transferência de elétrons (R_{ct}), um elemento de fase constante ($CPE1$) e uma resistência de Warburg (W), Figura 12f.

Após o procedimento de eletropolimerização, o GCE/MIP apresentou o menor R_{ct} ($0,97 \text{ p}\Omega \text{ cm}^2$, Figura 12b) em comparação com o GCE não modificado ($464 \text{ }\Omega \text{ cm}^2$, Figura 12a). Estes resultados indicam que a transferência de elétrons é cerca de $4,8 \times 10^{14}$ vezes maior quando

o GCE é modificado com o filme PPy, indicando que as modificações facilitaram a transferência de elétrons. Após a extração do limoneno, o MIP Rct aumenta para $101 \Omega \text{ cm}^2$ devido ao processo de superoxidação do PPy (Figura 12c) e diminui a condutividade do MIP sintetizado. Após o processo de religação, o Rct aumenta para $136 \Omega \text{ cm}^2$, expondo assim o reconhecimento do analito pelo sensor MIP (Figura 12d). Estes resultados implicam que as cavidades impressas para detecção de limoneno foram formadas com sucesso na matriz do filme PPy. A eletropolimerização do GCE/NIP possui um valor de Rct próximo ao obtido para o GCE/MIP, chegando a $1,11 \text{ p}\Omega \text{ cm}^2$ (Figura 12f). Este resultado está de acordo com o observado na Figura 8, ou seja, o limoneno não interfere no comportamento da eletropolimerização.

Figura 12. Análise EIS de (a) GCE, (b) GCE/MIP após eletropolimerização, (c) GCE/MIP após extração de limoneno, (d) GCE/MIP após religação de limoneno e (e) GCE/NIP após eletropolimerização. (f) Circuito eletroquímico equivalente usado para ajustar os diagramas de EIS.



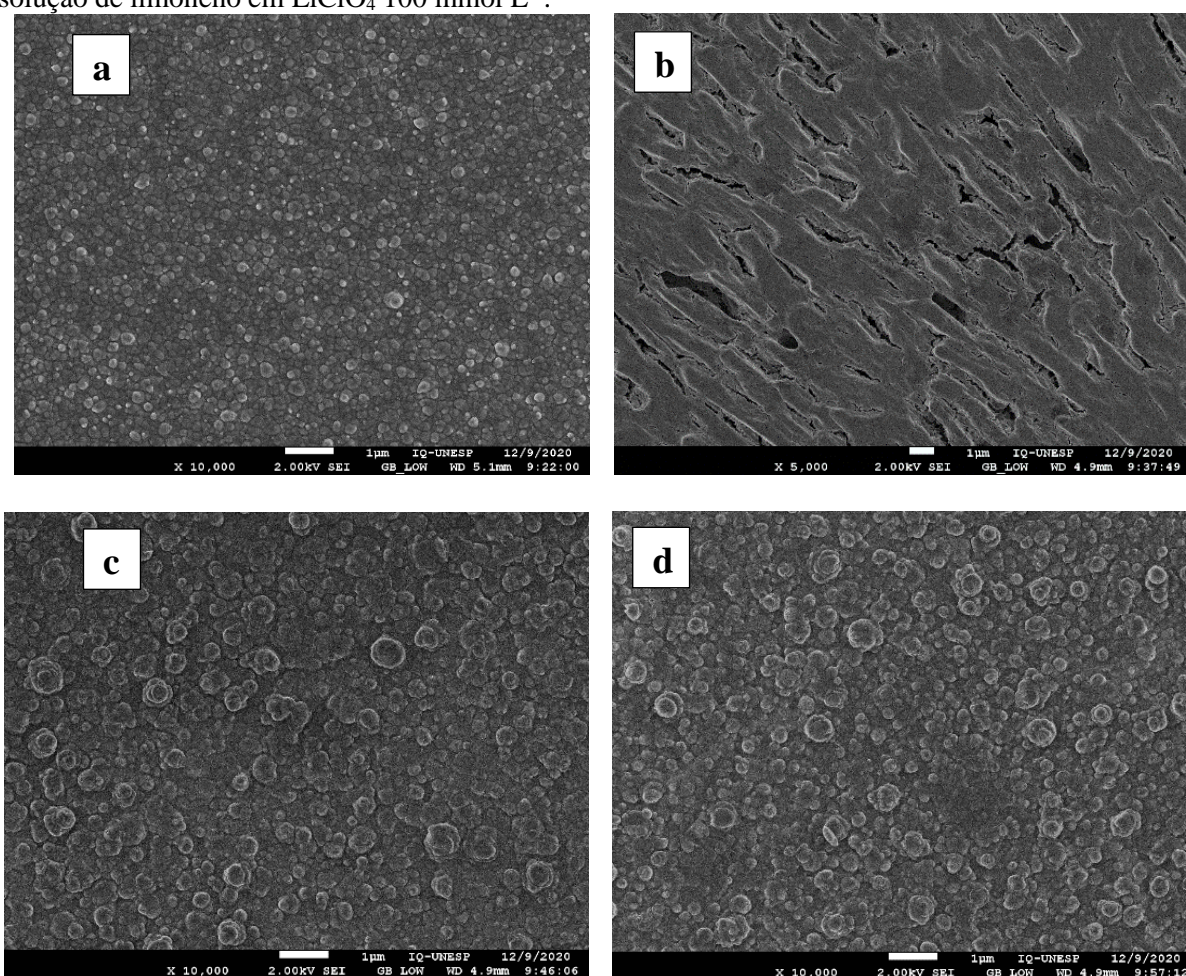
Fonte: elaborada pela autora.

4.4 Caracterização morfológica do eletrodo GCE/MIP

A morfologia dos eletrodos foi avaliada por imagens de MEV, e sua composição por espectroscopia de dispersão de energia de raios X (EDX). As imagens MEV-FEG da caracterização morfológica do eletrodo podem ser observadas na Figura 13.

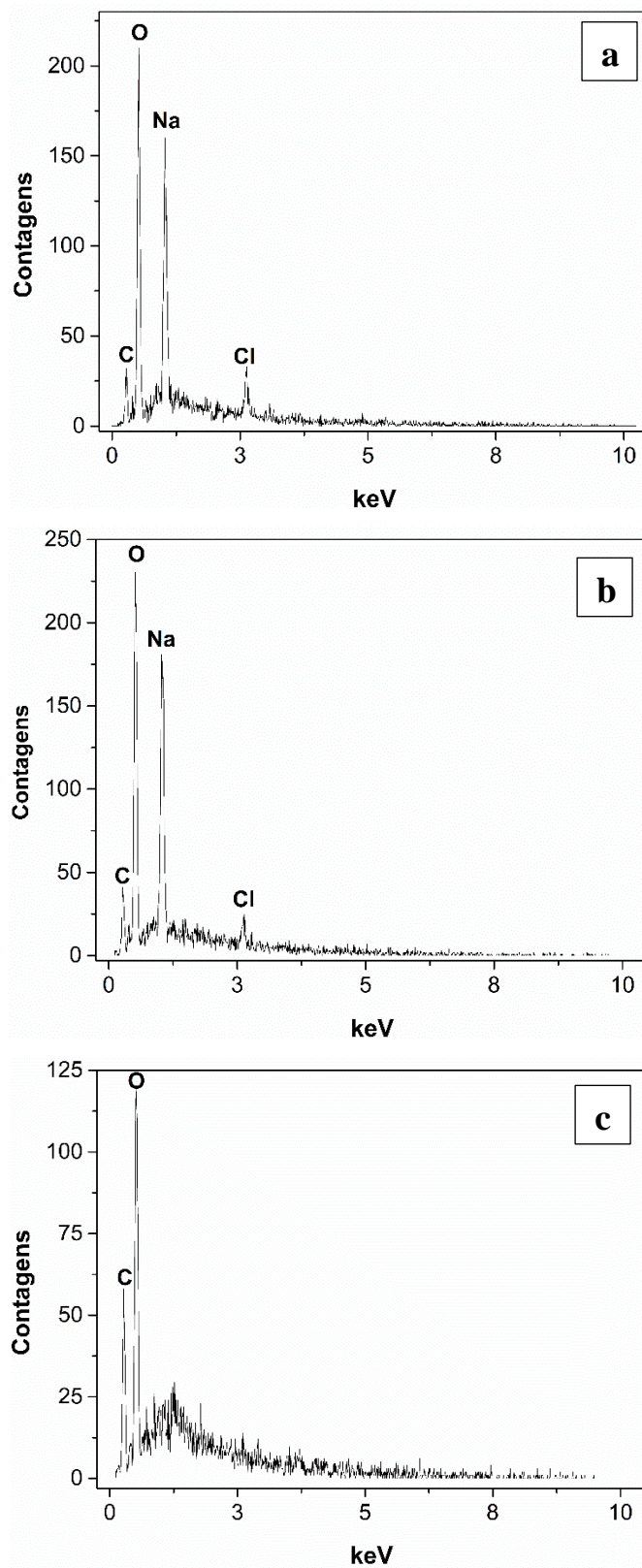
A superfície mostrada na Figura 13a refere-se ao GCE modificado com NIP após passar pelas etapas de eletropolimerização e superoxidação do PPy na ausência de limoneno. Pode-se observar a superfície do GCE recoberta pelo filme de PPy construído contendo limoneno, notado pela rugosidade adquirida (Figura 13b). Já a imagem representada em Figura 13c mostra o sensor GCE/MIP após extração de limoneno, no qual o processo de superoxidação do PPy leva a um rearranjo da cadeia polimérica, alterando a morfologia no sentido de um formato esférico com ênfase nas cavidades seletivas. Finalmente, o GCE/MIP é mostrado após 15 minutos do estágio de religação do limoneno (Figura 13d). Como esperado, as moléculas de limoneno ligam-se novamente ao filme de PPy, o que é corroborado pelo preenchimento das cavidades da matriz esférica.

Figura 13. Imagens MEV de (a) GCE/NIP após extração, (b) GCE/MIP após eletropolimerização, (c) GCE/MIP após extração de limoneno e (d) GCE/MIP após 15 minutos de religação em $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ solução de limoneno em LiClO_4 100 mmol L^{-1} .



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 14. Espectro EDX para (a) GCE/NIP após extração, (b) GCE/MIP após extração de limoneno e (c) GCE/MIP após 15 minutos de religação em solução de limoneno $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em LiClO_4 100 mmol L^{-1} .



Fonte: elaborada pela autora.

As análises da técnica de EDX foram realizadas para substanciar a composição de cada material presente nas modificações do GCE (Figura 14). Todas as superfícies apresentam carbono (C) e oxigênio (O) em sua composição, com predominância de carbono na superfície do GCE/MIP após religação do limoneno, como esperado com o aumento do número de moléculas de hidrocarbonetos (Figura 14c). Ambas as imagens – Figura 14a e Figura 14b – apresentam alta concentração de sódio (Na), em virtude da solução de NaOH utilizada como extrator de limoneno.

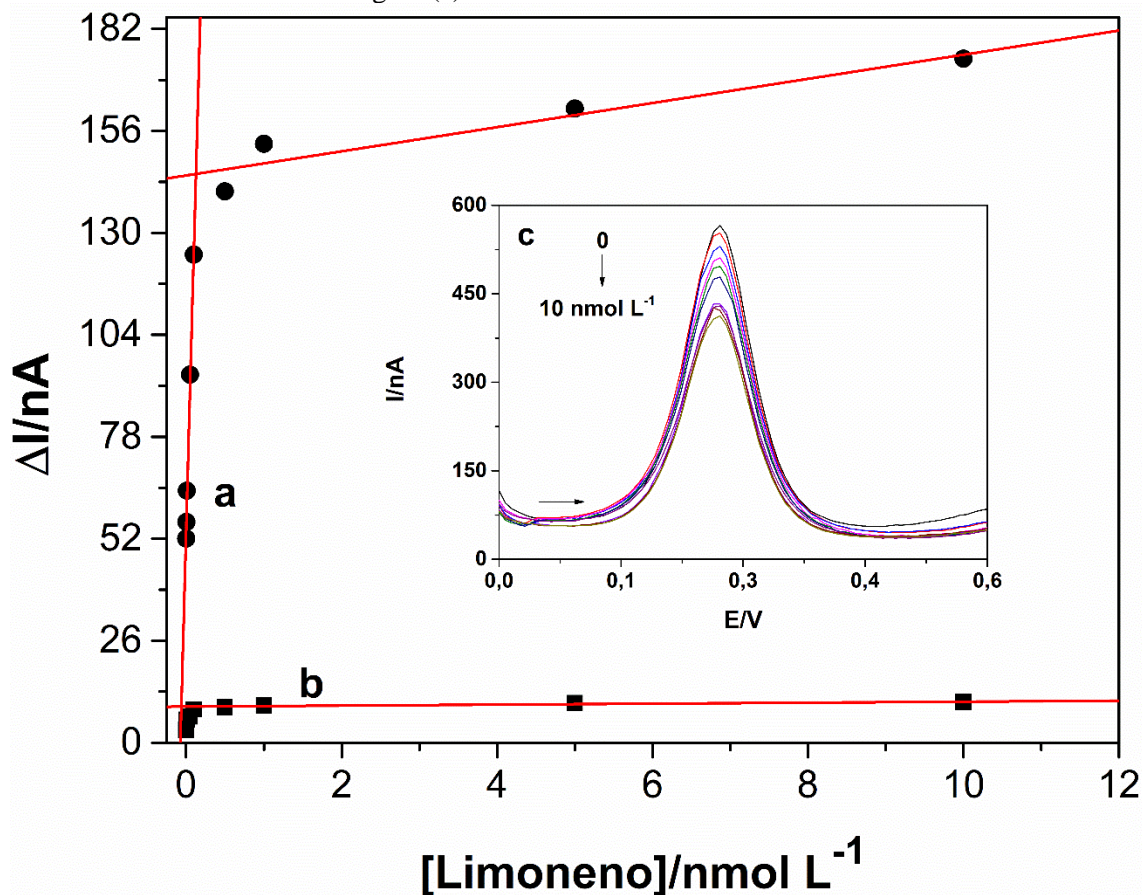
4.5 Performance analítica do eletrodo GCE/MIP

Os valores de mérito do método desenvolvido para determinação de limoneno aplicando o sensor MIP foram avaliados através de curvas analíticas. As curvas analíticas foram examinadas através da análise das concentrações das soluções padrão de limoneno (x , mol L⁻¹) com as respectivas variações das correntes de pico anódica da sonda redox (y , ΔI), antes e após a religação da molécula de limoneno nas cavidades formadas (Figura 15). O mesmo procedimento foi adotado para o sensor NIP de controle (Figura 15b). Observou-se que o ΔI se avoluma à medida que aumenta a concentração de limoneno, devido à ocupação das cavidades pelas moléculas de limoneno (Figura 15a).

Soluções de limoneno foram preparadas na faixa de concentração de 1,0 pmol L⁻¹ a 10 nmol L⁻¹. O sensor MIP exibe faixa linear que cobre a faixa de concentração de 1,0 a 100 pmol L⁻¹ ($\Delta I/nA = 9,0 \times 10^{11} C_{\text{limoneno}} + 52,5$ e R de 0,998) com limite de detecção baixo de 0,87 pmol L⁻¹, limite de quantificação de 2,9 pmol L⁻¹ e sensibilidade de $9,0 \times 10^{11}$ nA mol⁻¹ L (Figura 15a).

Como observado na Figura 15a, a existência de duas regiões lineares é atribuída à afinidade entre os sítios impressos e as moléculas de limoneno. Quando a concentração de limoneno é baixa, as moléculas ocupam as cavidades de alta afinidade localizadas na parte superficial do filme. No entanto, quando a concentração de limoneno é elevada, é provocado um declínio na tangente da equação de regressão linear graças à ocupação dos locais de menor afinidade, que são localizados mais no interior da matriz polimérica [43].

Figura 15. Curvas analíticas para detecção de limoneno usando (a) sensor MIP e (b) NIP em $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ após 15 minutos de religação em solução de limoneno ($1,0 \text{ pmol}$ a 10 nmol L^{-1} em $LiClO_4$ 100 mmol L^{-1}). Voltamogramas DPV correspondentes à curva analítica MIP são exibidos na imagem (c).



Fonte: elaborada pela autora.

O desempenho do sensor GCE/MIP foi comparado com outros métodos relatados na literatura para detecção de limoneno, incluindo cromatografia gasosa, espectrometria de massa, espectrometria de massa tandem acoplada a cromatografia gasosa, sensores de microbalança de cristal de quartzo e sensores eletroquímicos à base de grafeno dopados com enxofre, que estão inseridos na Tabela 1. O sensor desenvolvido apresentou o menor limite de detecção em comparação aos métodos alternativos, chegando a $0,87 \text{ pmol L}^{-1}$. Enquanto isso, métodos convencionais como GC-MS/MS só atingiram limites de detecção de limoneno tão baixos quanto $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ [25].

Tabela 1. Comparação da faixa linear e limite de detecção de alguns métodos relatados na literatura para determinação de limoneno.

Método de Detecção	Intervalo Linear	Limite de Detecção	Referência
GC-MS/MS ^a	0,001 - 1,0 mg L ⁻¹	1000 ng L ⁻¹	[25]
Microbalança de Quartzo	1,0 – 100 mg L ⁻¹	0,2 mg L ⁻¹	[30]
QCM ^b	-	10 mg L ⁻¹	[35]
GC-MS ^c	3,0 - 20 mg L ⁻¹	1,7 mg L ⁻¹	[49]
GC-MS	1,0 – 30 mg L ⁻¹	1,0 mg L ⁻¹	[50]
QCM	0,06 mg L ⁻¹ – 6,0 mg L ⁻¹	0,3 mg L ⁻¹	[51]
Sensor TPP/AuNPs-S-Gr ^d	1,4 - 82 mg L ⁻¹	0,4 mg L ⁻¹	[52]
Sensor GCE/MIP	0,14 - 14 ng L ⁻¹	0,12 ng L ⁻¹	Este trabalho

^a Cromatografia gasosa – espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS); ^b Microbalança de cristal de quartzo (QCM); ^c Cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS); ^d Nanopartículas de grafeno-ouro dopadas com enxofre modificadas com 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfina (TPP/AuNPs-S-Gr).

Fonte: elaborado pelo autor.

4.6 Seletividade do eletrodo GCE/MIP

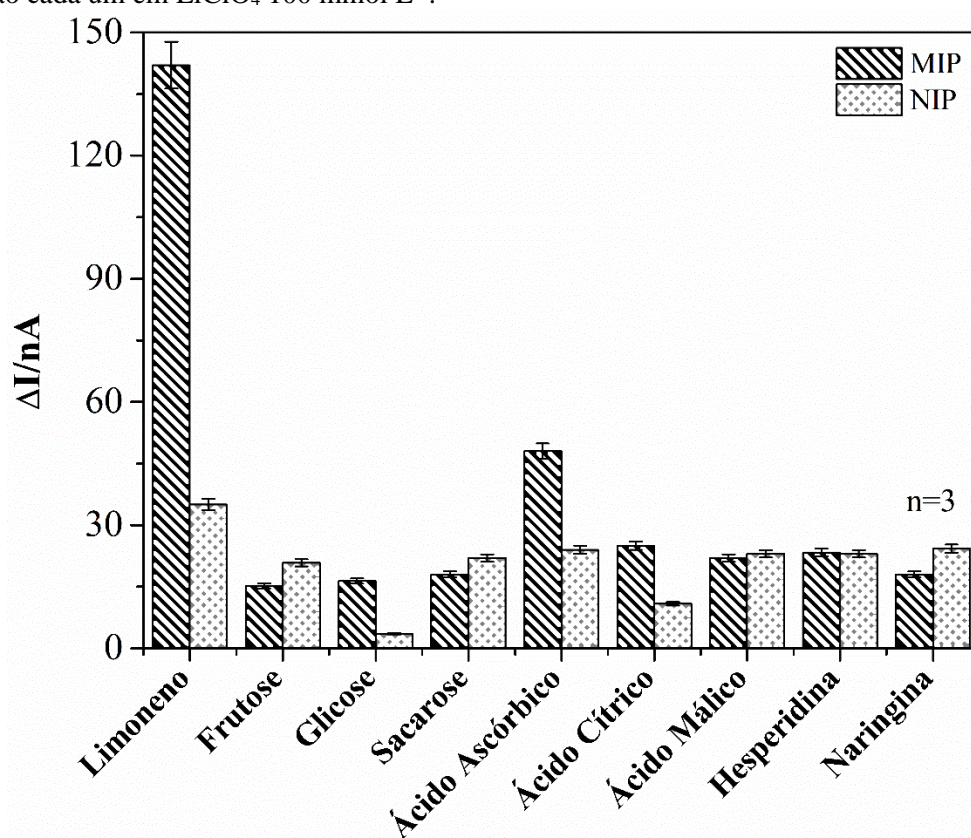
A principal qualidade do GCE/MIP deve ser a alta seletividade e afinidade do filme impresso pela molécula de interesse. Para avaliar esses parâmetros, possíveis moléculas interferentes foram analisadas utilizando o sensor eletroquímico. Os testes foram realizados com compostos presentes em efluentes cítricos e que apresentam interações químicas semelhantes ao limoneno, como frutose, sacarose, glicose, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido málico, hesperidina e naringina. A posição e o tipo de grupos funcionais e o tamanho da molécula são os principais fatores que influenciam a atividade de interferência no sensor baseado em MIP. Desta forma, moléculas maiores com estrutura química diferente normalmente não interferem na análise.

Para avaliação do estudo de seletividade, o DPV foi aplicado conforme condições citadas na *Subseção 3.4* utilizando a solução K₃[Fe(CN)]₆ como sonda redox. Limoneno e

moléculas potencialmente interferentes foram adicionados individualmente às soluções de religação na concentração de 10 pmol L^{-1} . Os resultados obtidos tanto para os eletrodos MIP quanto NIP são mostrados na Figura 16 e na Tabela 2.

Os resultados obtidos na Tabela 2 para o fator de impressão ($\alpha = \Delta I_{\text{MIP}} / \Delta I_{\text{NIP}}$) mostram que a resposta de corrente do eletrodo GCE/MIP para o limoneno foi cerca de 4,1 vezes maior em comparação ao eletrodo GCE/NIP, evidenciando que a formação do filme PPy com impressão molecular foi bem-sucedido. Além disso, a intensidade de corrente do eletrodo GCE/MIP para ácido ascórbico foi cerca de 2 a 3 vezes maior em comparação com todos os demais compostos analisados. Esses dados confirmam a potencial interferência de moléculas com grupos funcionais semelhantes aos do limoneno (Figura 16). No entanto, a resposta do sensor ao limoneno foi 3 vezes superior à do ácido ascórbico, endossando a avaliação do sensor como seletivamente eficaz, e detectando preferencialmente moléculas de limoneno entre os compostos em estudo (Tabela 2).

Figura 16. Estudo de seletividade comparando respostas de corrente entre os sensores GCE/MIP e GCE/NIP para detecção de 10 pmol L^{-1} de limoneno e possíveis interferentes após 15 minutos de religação cada um em LiClO_4 100 mmol L^{-1} .



Fonte: elaborada pela autora.

A diferença nos valores atuais observados para frutose, glicose, sacarose, hesperidina e naringina é atribuída ao tamanho relativamente maior dessas moléculas quando comparadas às proporções de limoneno. O fenômeno do impedimento estérico dificulta a entrada bem-sucedida das moléculas de interferentes nas cavidades impressas (Tabela 2). Para moléculas de ácido cítrico e ácido málico, que são ricas em grupos funcionais hidroxila, estabelecem-se correntes 6 vezes menores em comparação ao limoneno; essa diferença maior indica que a conformação dos grupos funcionais é um fator crucial para a aplicabilidade do sensor MIP (Tabela 2).

Quanto aos resultados obtidos para o fator de seletividade [$\beta = \alpha(\text{limoneno})/\alpha(\text{interferente})$], quanto mais próximo o valor de 1,0, maior a seletividade. Consequentemente, conforme observado na Tabela 2, a Glicose é o interferente com fator de seletividade mais próximo do analito de interesse (Limoneno). Este resultado poderia classificar a glicose como uma possível interferência, caso não houvesse a grande diferença entre o delta de corrente (ΔI) obtido para o limoneno e para a glicose. Portanto, os resultados mostram que o eletrodo proposto é adequado para a determinação seletiva da molécula de limoneno, mesmo em amostras complexas.

Tabela 2. Fator de impressão (α) e fator de seletividade (β) para o sensor GCE/MIP e para o sensor GCE/NIP na presença de moléculas interferentes.

Interferente	MIP ($\Delta I/nA$)	NIP ($\Delta I/nA$)	α	β
Limoneno	142	35,0	4,1	1,0
Frutose	15,2	20,8	0,7	5,6
Glicose	16,4	3,5	4,6	0,9
Sacarose	18,0	22,0	0,8	5,0
Ácido Ascórbico	48,0	24,0	2,0	2,0
Ácido Cítrico	25,0	10,8	2,3	1,8
Ácido Málico	22,0	23,0	1,0	4,2
Hesperidina	23,3	23,0	1,0	4,0
Naringina	18,0	24,3	0,7	5,5

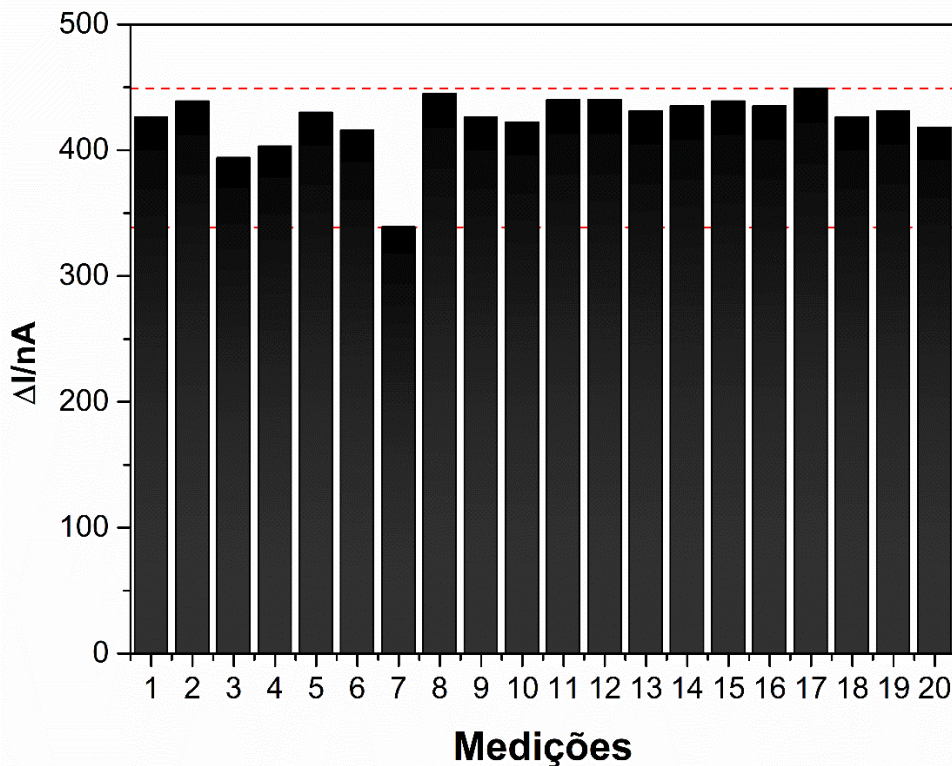
Fonte: elaborada pela autora.

4.7 Estabilidade de armazenamento, repetibilidade e reprodutibilidade do eletrodo GCE/MIP

Os estudos foram realizados para investigar a estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade do método proposto utilizando o sensor GCE/MIP. O estudo de repetibilidade foi realizado por meio de 20 análises consecutivas utilizando a sonda redox após o processo de religação em 10 pmol L^{-1} de limoneno por DPV. O sensor GCE/MIP exibiu um desvio padrão relativo (RSD) de 5,7% para as 20 medições utilizando o mesmo sensor (Figura 17). Este resultado indica a excelente capacidade do sensor em detectar limoneno após análises consecutivas.

A reprodutibilidade do GCE/MIP foi explorada usando três eletrodos preparados independentemente da mesma maneira (Figura 18). As respostas de corrente dos eletrodos variaram de 119,4 a 128,3 nA e apresentaram RSD de 3,8% ($n=3$). Este resultado indica que o sensor MIP produzido pelo método desenvolvido possui excelente reprodutibilidade.

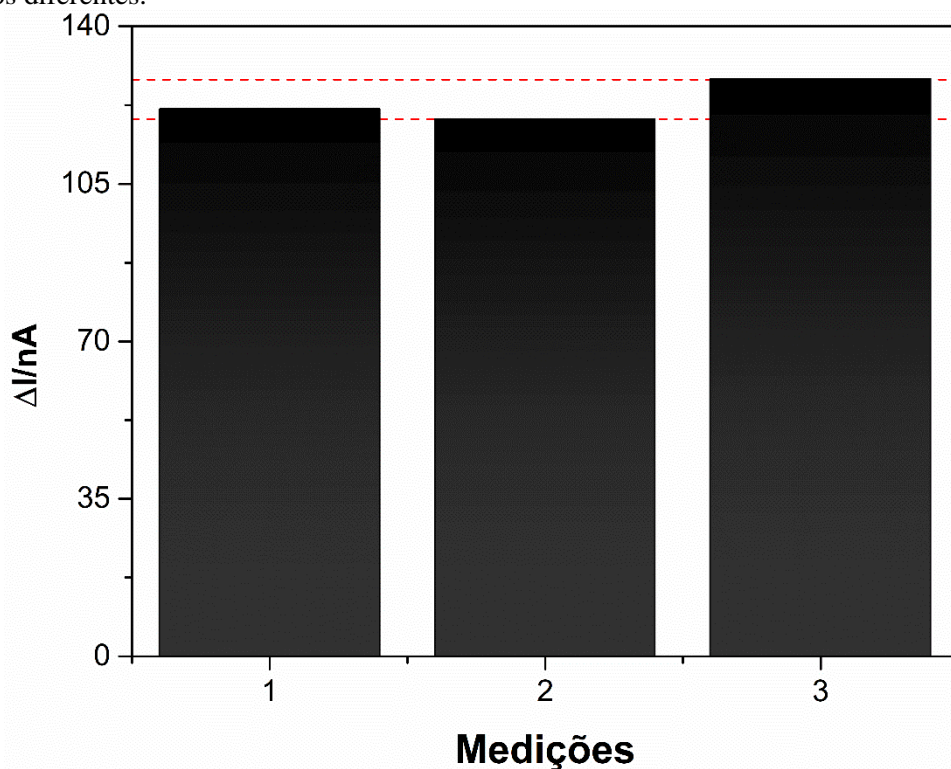
Figura 17. Medições de repetibilidade para detecções consecutivas de limoneno de 10 pmol L^{-1} usando o mesmo eletrodo ($n = 20$).



Fonte: elaborada pela autora.

A estabilidade do sensor GCE/MIP também foi avaliada ao longo do tempo. Após o processo de religação, o GCE/MIP foi armazenado por um período de 26 dias em temperatura ambiente. A resposta atual deste eletrodo diminuiu em 100,0, 84,2, 82,2, 54,5 e 49,5% após 1, 3, 6, 19 e 26 dias de uso, respectivamente. A diminuição na resposta do sensor MIP se deve ao fato do limoneno ser uma molécula volátil. Ao longo do tempo avaliado, as moléculas de limoneno evaporam da superfície do sensor conforme esperado. Porém, o sensor MIP desenvolvido consegue manter 50% da resposta, indicando que mesmo em temperatura ambiente, o sensor consegue manter o analito preso em suas cavidades.

Figura 18. Medições de reprodutibilidade para detecções de limoneno de 10 pmol L^{-1} usando três eletrodos diferentes.



Fonte: elaborada pela autora.

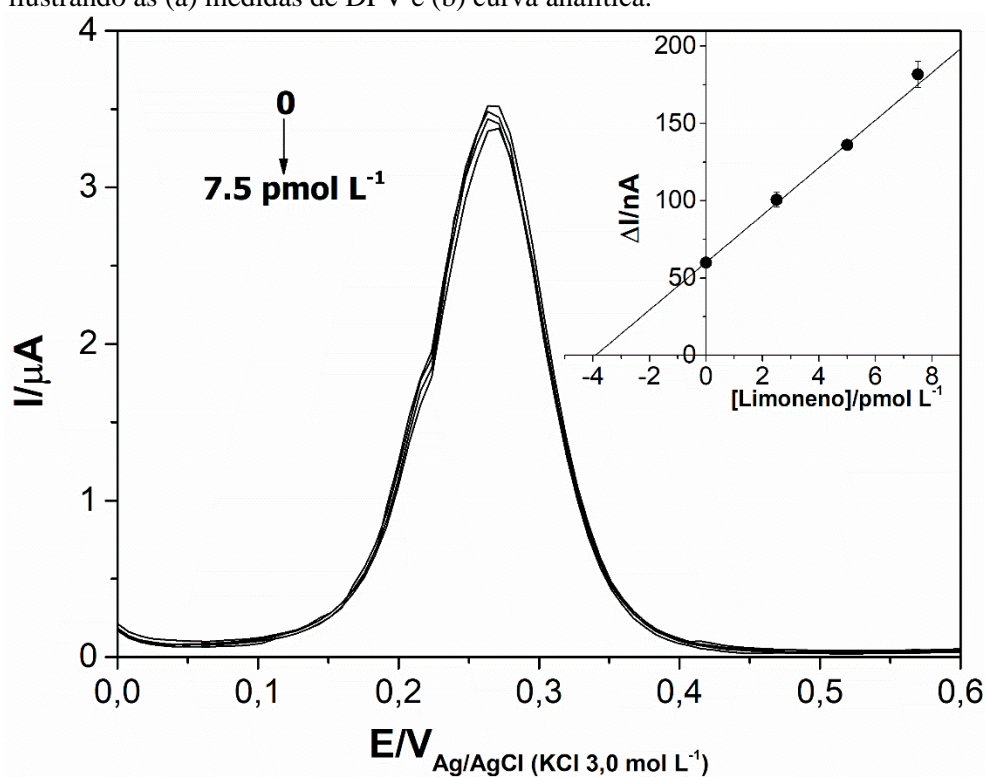
4.8 Determinação do limoneno em águas residuárias da indústria da laranja

A determinação do limoneno foi realizada em amostras de água amarela coletadas em uma indústria cítrica local e, posteriormente, submetidas à análise voltamétrica utilizando o sensor GCE/MIP. Para este estudo, foi aplicado o método de adição de padrões, que consiste em adicionar concentrações conhecidas da substância de interesse à amostra. As concentrações de limoneno adicionado variaram de $2,5$ a $7,5 \text{ pmol L}^{-1}$ e uma curva de adição de padrão foi

construída relacionando as quantidades de limoneno adicionadas à amostra e o sinal analítico (ΔI) (Figura 19).

As amostras foram preparadas conforme descrição disponível na *Subseção 3.7*. Todas as medições foram realizadas em triplicata, com eletrodos diferentes. A curva de adição padrão foi obtida extrapolando a reta ao eixo das abcissas, levando em consideração as diluições. A curva (Figura 19) obtida corresponde a $\Delta I/nA = 1,5 \times 10^{13} [\text{limoneno}] + 60$ com um R de 0,996. O valor de limoneno encontrado nesta amostra real foi de $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($0,20 \text{ g L}^{-1}$).

Figura 19. Método de adição de padrão a amostra de água amarela para determinação e quantificação de limoneno, ilustrando as (a) medidas de DPV e (b) curva analítica.



Fonte: elaborada pela autora.

Para avaliar a precisão do método desenvolvido, a recuperação foi avaliada utilizando o sensor MIP. O percentual de recuperação foi calculado dividindo a concentração detectada pelo valor agregado e multiplicando o resultado por cem, obtendo-se, assim, o percentual de recuperação. No presente estudo, o percentual de recuperação varia de $98 \pm 3,0$ a $105 \pm 6,6\%$ (Tabela 3), indicando que o sensor GCE/MIP apresenta um excelente grau de precisão, sendo eficaz e confiável para detecção de limoneno em amostras reais.

Tabela 3. Determinação de limoneno em amostras de água amarela da indústria citrícola (n=3).

Amostra	Quantidade Adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Quantidade Detectada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
	0	$3,7 \pm 0,18$	-
Água	2,5	$6,3 \pm 0,12$	$105 \pm 6,6$
Amarela	5,0	$8,6 \pm 0,15$	$98 \pm 3,0$
	7,5	$11,4 \pm 0,15$	$103 \pm 2,4$

Fonte: elaborada pela autora.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sensor eletroquímico baseado no polímero de pirrol molecularmente impresso na superfície do GCE foi otimizado com sucesso através do exame de parâmetros relativos às concentrações de moléculas e ao número de ciclos de etapas significativas da construção do eletrodo modificado.

Nas condições otimizadas aplicadas, o GCE/MIP apresentou limite de detecção de 0,87 pmol L⁻¹, sendo este o menor limite relatado na literatura em comparação com os demais métodos analíticos usados convencionalmente para determinação de limoneno. A sensibilidade foi de $9,0 \times 10^{11}$ nA mol⁻¹ L, com patamares de reprodutibilidade e repetibilidade confiáveis e mantendo até 50% da resposta do sensor após 26 dias de armazenamento, conforme avaliado no estudo de estabilidade.

Além disso, o sensor exibiu notável seletividade para limoneno, tendo um fator de impressão cerca de 4,1 vezes maior para o GCE/MIP em comparação ao eletrodo GCE/NIP, além de apresentar um delta de corrente (ΔI) expressivo para o limoneno em comparação com outras moléculas complexas presentes na água amarela. O grau de recuperação do limoneno encontrado em amostras reais foi entre 98 e 105%, sinalizando um excelente grau de exatidão do método proposto.

Portanto, a aplicação do sensor GCE/MIP construído neste trabalho pode ser oportunamente empregada como alternativa aos métodos analíticos mais caros atualmente utilizados para determinação de limoneno, abrindo também oportunidades para aplicação em quaisquer outras indústrias onde essa substância esteja presente.

REFERÊNCIAS

- [1] CEPEA – CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **PIB do agronegócio brasileiro**. Piracicaba: CEPEA, 2023. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [2] FUNDECITRUS – FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Relatório de atividades - Junho 2022/Maio 2023**. Araraquara: FUNDECITRUS, 2023. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2023.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [3] CITRUSBR – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. **Processamento Industrial**. São Paulo: CITRUSBR, 2023. Disponível em: <https://citrusbr.com/estatisticas/processamento-industrial/>. Acesso em: 20 out. 2023.
- [4] CITRUSBR – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. **A cadeia do suco de laranja brasileiro: Position Paper**, Safra 2018/2019. São Paulo: CITRUSBR, 2019. Disponível em: https://citrusbr.com/wp-content/uploads/2021/03/Position-Paper_2019.pdf. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [5] CITRUSBR – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. **Produção de Suco**. São Paulo: CITRUSBR, 2023. Disponível em: <https://citrusbr.com/estatisticas/producao-de-suco/>. Acesso em: 20 out. 2023.
- [6] FUNDECITRUS – FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Reestimativa da safra de laranja 2020/21 do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro – fechamento em abril/2021**. Araraquara: FUNDECITRUS, 2021. Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0421_Fechamento_da_Safra_de_Laranja.pdf. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [7] NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. **Revista CitrusBR**, Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: https://citrusbr.com/wp-content/uploads/2020/10/Retrato_Citricultura_Brasileira_MarcosFava.pdf. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [8] TEIXEIRA, P. de T. L.; GIACOMELLI, S. R.; OGLIARI, M. Chemical characterization of Valencia, Salustiana and Lane Late sweet oranges fruits in Frederico Westphalen-RS. **Citrus Res. Technol.**, v. 37, n. 1, p. 76–81, 2016. DOI 10.4322/crt.icc071. Disponível em: <http://www.citrusrt.periodikos.com.br/article/doi/10.4322/crt.ICC071>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [9] ANAGNOSTOPOULOU, M. A.; KEFALAS, P.; KOKKALOU, E.; ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. **Biomedical chromatography**, v. 19, n. 2, p. 138–148, 2005. DOI 10.1002/bmc.430. Disponível em:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15515108/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [10] OLABINJO, O. O.; OGUNLOWO, A. S.; AJAYI, O. O.; OLALUSI, A. P. Analysis of Physical and Chemical Composition of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Peels. **Int. J. Environ. Agric. Biotechnol.**, v. 2, n. 4, p. 2201–2206, 2017. DOI 10.22161/ijeab/2.4.80. Disponível em: <https://ijeab.com/detail/analysis-of-physical-and-chemical-composition-of-sweet-orange-citrus-sinensis-peels/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [11] RANGANNA, S.; GOVINDARAJAN, V. S.; RAMANA, K. V. R.; KEFFORD, J. F. Citrus fruits — Varieties, chemistry, technology, and quality evaluation. Part II. Chemistry, technology, and quality evaluation. A. Chemistry. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 18, n. 4, p. 313–386, 2009. DOI 10.1080/10408398309527366. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398309527366>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [12] IGLESIAS, D. J.; CERCÓS, M.; COLMENERO-FLORES, J. M.; NARANJO, M. A.; RÍOS, G.; CARRERA, E.; RUIZ-RIVERO, O.; LLISO, I.; MORILLON, R.; TADEO, F. R.; TALON, M. Physiology of citrus fruiting. **Brazilian J. Plant Physiol.**, v. 19, n. 4, p. 333–362, 2007. DOI 10.1590/S1677-04202007000400006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjpp/a/S4CmGP87JFHx4TtfTbpV9cx/#>. Acesso em: 15 nov. 2023
- [13] CISOL – COMPANHIA INDUSTRIAL DE SUCOS E ÓLEOS DE LIMÃO E LARANJA. **Processo de Produção**. Arthur Nogueira: CISOL, 2016. Disponível em: <https://cisol.com/processo-de-producao>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [14] CITRUSBR – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. **Suco de Laranja Brasileiro: Na Rota da Sustentabilidade**. Araraquara: FUNDECITRUS, 2012. Disponível em: https://issuu.com/citrusbr/docs/folder_citrus_portugues_vers_o_site#:~:text=Em%20puco%20tempo%20o%20Brasil,desenvolvimento%20sustent%20C3%A1vel%20no%20contexto%20mundial. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [15] CITRUSBR – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. A indústria brasileira de suco de laranja. Araraquara: **Revista CitrusBR**, 2015, 69 p. Disponível em: <https://citrusbr.com/wp-content/uploads/2021/03/A-industria-brasileira-de-suco-de-laranja.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [16] TAVARES, V. B.; SIVIERI, K.; CERON, C. R.; SILVA, R. da.; TRABUCO, E.; LOMBARDI, F. R.; GOMES, E. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 722–725, 1998. DOI 10.1590/S0100-40421998000600010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/x8RMVjRtJXbGd8bdwNvDMHs/#>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [17] VIUDA-MARTOS, M.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; SAYAS-BARBERA, E.; SENDRA, E.; PEREZ-ALVAREZ, J. A. Physicochemical characterization of the orange juice waste water of a citrus by-product. **J. Food Process. Preserv.**, v. 35, n. 2,

- p. 264–271, 2011. DOI 10.1111/j.1745-4549.2009.00450.x. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4549.2009.00450.x>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [18] DI MAURO, A.; FALLICO, B.; PASSERINI, A.; MACCARONE, E. Waste water from citrus processing as a source of hesperidin by concentration on styrene-divinylbenzene resin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 6, p. 2291–2295, 2000. DOI 10.1021/jf990992w. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf990992w>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [19] SEIGLER, D. S. **Plant secondary metabolism**. v. 1. Boston: Springer, 1998. DOI 10.1007/978-1-4615-4913-0. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4615-4913-0>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [20] RAVICHANDRAN, C.; BADGUJAR, P. C.; GUNDEV, P.; UPADHYA, A. Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. **Food Chem. Toxicol.**, v. 120, p. 668–680, 2018. DOI 10.1016/j.fct.2018.07.052. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30075315/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [21] RAVICHANDRAN, C.; BADGUJAR, P. C.; GUNDEV, P.; UPADHYA, A. Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. **Food Chem. Toxicol.**, v. 120, p. 668–680, 2018. DOI 10.1016/j.fct.2018.07.052. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30075315/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [22] SUN, J. D-limonene: Safety and clinical applications. **Altern. Med. Rev.**, v. 12, n. 3, p. 259–264, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18072821/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [23] MEDVEDOVICI, A.; UDRESCU, S.; DAVID, V. Use of a green (bio) solvent - limonene - as extractant and immiscible diluent for large volume injection in the RPLC-tandem MS assay of statins and related metabolites in human plasma. **Biomed. Chromatogr.**, v. 27, n. 1, p. 48–57, 2013. DOI 10.1002/bmc.2747. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511331/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [24] HÖGNADÓTTIR, A.; ROUSEFF, R. L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 998, n. 1–2, p. 201–211, 2003. DOI 10.1016/S0021-9673(03)00524-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967303005247?via%3Dihub>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [25] CHEN, C.; SHENG, Y.; HU, Y.; SUN, J.; LI, W.; FENG, H.; TANG, L. Determination of d-limonene in mice plasma and tissues by a new GC–MS/MS method: Comparison of the pharmacokinetics and tissue distribution by oral and inhalation administration in mice. **Biomed. Chromatogr.**, v. 33, n. 7, p. 1–10, 2019. DOI 10.1002/bmc.4530. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.4530>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [26] VICHI, S.; ISABEL, A.; PIZZALE, L.; CONTE, L. S.; BUXADERAS, S.; LOPEZ-

- TAMAMES, E. Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. **Journal of Chromatography A**, v. 983, p. 19–33, 2003. DOI 10.1016/S0021-9673(02)01691-6. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967302016916>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [27] BAUERSFELD, M. L.; BÜCKING, M.; BRUCKERT, J.; WÖLLENSTEIN, J. Miniaturised gas chromatographic system with metal oxide gas sensor array for fast detection of off-flavors. **16th International Solid-State Sensors, Actuators And Microsystems Conference**, 2011, Beijing, China, p. 2086-2089. DOI 10.1109/TRANSDUCERS.2011.5969262. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/5969262>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [28] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. University of Texas at Austin: Texas, 2001.
- [29] FIETZEK, C.; HERMLE, T.; ROSENSTIEL, W.; SCHURIG, V. Chiral discrimination of limonene by use of β -cyclodextrin-coated quartz-crystal-microbalances (QCMs) and data evaluation by artificial neuronal networks. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 371, n. 1, p. 58–63, 2001. DOI 10.1007/s002160100899. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11605760/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [30] HAMACHER, T.; NIESS, J.; LAMMERS, P. S.; DIEKMANN, B.; BOEKER, P. Online measurement of odorous gases close to the odour threshold with a QMB sensor system with an integrated preconcentration unit. **Sensors Actuators, B Chem.**, v. 95, n. 1–3, p. 39–45, 2003. DOI 10.1016/S0925-4005(03)00400-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925400503004003>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [31] HAWARI, H. F.; SAMSUDIN, N. M.; AHMAD, M. N.; SHAKAFF, A. Y. M.; GHANI, S. A.; WAHAB, Y.; HASHIM, U. Recognition of Limonene volatile using Interdigitated Electrode molecular imprinted polymer sensor. **Proc. - 3rd Int. Conf. Intell. Syst. Model. Simulation**, 2012, p. 723–726, 2012. DOI 10.1109/ISMS.2012.103. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/6169793>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [32] HAWARI, H. F.; SAMSUDIN, N. M.; AHMAD, M. N.; SHAKAFF, A. Y. M.; GHANI, S. A.; WAHAB, Y.; ZAABA, S. K.; AKITSU, T. Array of MIP-Based Sensor for Fruit Maturity Assessment. **Procedia Chem.**, v. 6, p. 100–109, 2012. DOI 10.1016/j.proche.2012.10.135. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876619612002094>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [33] IGBAL, N.; MUSTAFA, G.; REHMAN, A.; BIEDERMANN, A.; NAJAFI, B.; LIEBERZEIT, P. A. QCM-Arrays for sensing terpenes in fresh and dried herbs via bio-mimetic MIP layers. **Sensors**, v. 10, n. 7, p. 6361–6376, 2010. DOI 10.3390/s100706361. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8220/10/7/6361>. Acesso em: 15 nov. 2023.

- [34] MONGE, M. E.; BULONE, D.; GIACOMAZZA, D.; NEGRI, M.; BERNIK, D. L. Electronic nose screening of limonene release from multicomponent essential oils encapsulated in pectin gels. **Comb. Chem. High Throughput Screen.**, v. 7, n. 4, p. 337–344, 2004. DOI 10.2174/1386207043328689. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15200381/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [35] YUWONO, A. S.; LAMMERS, P. S. Performance Test of a Sensor Array-Based Odor Detection Instrument. **Agric. Eng. Int. CIGR J.**, p. 1–16, 2004. DOI 1682-1130. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=6cb5fd28dad234ae0c7694cb0ff91d492fbc1f69>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [36] LOWINSOHN, D.; M. BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: Considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318–1325, 2006. DOI 10.1590/S0100-40422006000600029. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/svKFgdMsc9LsHqXjn3BrfZn/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [37] FU, L.; YU, A.; LAI, G. Conductive hydrogel-based electrochemical sensor: A soft platform for capturing analyte. **Chemosensors**, v. 9, n. 10, p. 1–18, 2021. DOI 10.3390/chemosensors9100282. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9040/9/10/282>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [38] TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP (‘Molecularly Imprinted Polymers’) no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1087–1101, 2005. DOI 10.1590/S0100-40422005000600025. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/t5CXf6V5y7vLyPRsXMTh5pB/?lang=pt>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [39] TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (‘Molecularly Imprinted Polymers’) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 2005. DOI 10.1590/S0100-40422005000600024. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/ZdqycMqxSQJkWCyxCJty66p/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [40] BLANCO-LÓPEZ, M. C.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, S.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUÑÓN-BLANCO, P. Electrochemical sensing with electrodes modified with molecularly imprinted polymer films. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 378, n. 8, p. 1922–1928, 2004. DOI 10.1007/s00216-003-2330-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15064901/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [41] SAYLAN, Y.; AKGÖNÜLLÜ, S.; YAVUZ, H.; ÜNAL, S.; DENIZLI, A. Molecularly imprinted polymer based sensors for medical applications. **Sensors (Switzerland)**, v. 19, n. 6, 2019. DOI 10.3390/s19061279. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8220/19/6/1279>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [42] POMPEU PRADO MOREIRA, L. F.; BUFFON, E.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and molecularly imprinted

- poly(phenol) for D-xylose determination. **Talanta**, v. 208, p. 120379, 2020. DOI 10.1016/j.talanta.2019.120379. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914019310124>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [43] BELUOMINI, M. A. **Sensores eletroquímicos para determinação de polióis na vinhaça de cana-de-açúcar baseados em eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos em grafeno contendo nanopartículas metálicas**. 2018. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/4bee54a7-1209-40e9-b0cb-651ff570ba5e>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [44] SCHWEIGER, B.; KIM, J.; KIM, Y. J.; ULBRICHT, M. Electropolymerized molecularly imprinted polypyrrole film for sensing of clofibric acid. **Sensors (Switzerland)**, v. 15, n. 3, p. 5870–5889, 2015. DOI 10.3390/s150304870. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8220/15/3/4870>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [45] OLAH, Á.; MOLNÁR, G. A. **Hydrocarbon Chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003.
- [46] SCHERER, R.; RYBBKA, A. C. P.; BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. **Food Chem.**, v. 135, n. 1, p. 150–154, 2012. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.03.111. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814612005961>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [47] SHARMA, P. S.; PIETRZYK-LE, A.; D’SOUZA, F.; KUTNER, W. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, n. 10, p. 3177–3204, 2012. DOI 10.1007/s00216-011-5696-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-011-5696-6>. Acesso em: 17 nov. 2023.
- [48] KOR, K.; ZAREI, K. Development and characterization of an electrochemical sensor for furosemide detection based on electropolymerized molecularly imprinted Polymer. **Talanta**, v. 146, p. 181–187, 2016. DOI 10.1016/j.talanta.2015.08.042. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914015302629>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [49] CAMARGO, F. P.; SARTI, A.; ALÉCIO, A. C.; SABATINI, C. A.; ADORNO, M. A. T.; DUARTE, I. C. S.; VARESCHE, M. B. A. Limonene quantification by gas chromatography with mass spectrometry (gc-ms) and its effects on hydrogen and volatile fatty acids production in anaerobic reactors. **Química Nova**, 2020. DOI 10.21577/0100-4042.20170557. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/TLhSz3gJPmq39pJ4yQwJGdg/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [50] CHEN, H.; CHAN, K. K.; BUDD, T. Pharmacokinetics of d-limonene in the rat by GC–MS assay. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 17, n. 4–5, p. 631–640, 1998. DOI 10.1016/S0731-7085(97)00243-4. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708597002434>. Acesso em: 15 nov. 2023

- [51] WEN, T.; SANG, M.; WANG, M.; HAN, L.; GONG, Z.; TANG, X.; LONG, X.; XIONG, H.; PENG, H. Rapid detection of d-limonene emanating from citrus infestation by *Bactrocera dorsalis* (Hendel) using a developed gas-sensing system based on QCM sensors coated with ethyl cellulose. **Sensors Actuators B Chem.**, v. 328, p. 129048, 2021. DOI 10.1016/j.snb.2020.129048. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925400520313952>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- [52] NICULAE, A. R.; STEFAN-VAN STADEN, R. I.; VAN STADEN, J. F.; GEORGESCU STATE, R. Sulfur-Doped Graphene-Based Electrochemical Sensors for Fast and Sensitive Determination of (R)-(+)-Limonene from Beverages. **Sensors**, v. 22, n. 15, p. 5851, 2022. DOI 10.3390/s22155851. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8220/22/15/5851>. Acesso em: 17 de nov. 2023.