

THIAGO DE MORAIS MARIANO

Desenvolvimento de sensor baseado em polímeros molecularmente impressos para determinação de álcoois superiores em óleo fúsel.

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

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

ARARAQUARA
2016

DADOS CURRICULARES

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Thiago de Moraes Mariano
Nacionalidade: Brasileira
Nascimento: 18/12/1984 – Sorocaba – SP
Endereço Profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara.
Departamento de Química Analítica
Laboratório de Eletroanalítica – NDCOM
Rua Prof. Francisco Degni, 55
Bairro Quitandinha
Araraquara
14800-060, SP - Brasil
Telefone: (16) 3301-9519
Endereço eletrônico: thiaguitobatera@gmail.com

2 Formação acadêmica/titulação

2014-2016: Mestrado em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, Brasil

Título: Desenvolvimento de sensor baseado em polímeros molecularmente impressos para determinação de álcoois superiores em óleo fúsel.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto.

2007-2013: Graduação em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Presidente Prudente, Brasil.

FICHA CATALOGRÁFICA

M333d Mariano, Thiago de Moraes
Desenvolvimento de sensor baseado em polímeros
molecularmente impressos para determinação de álcoois
superiores em óleo fúsel / Thiago de Moraes Mariano –
Araraquara : [s.n], 2016
54 f. : il.

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

1. Impressão molecular. 2. Grafeno. 3. Nanopartículas.
4. Etanol. 5. Detector. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

THIAGO DE MORAIS MARIANO

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

Araraquara, 11 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Hideko Yamanaka
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo
Instituto de Química – USP, São Carlos

Dedico este trabalho,

A Deus, por me abençoar quando eu menos mereço e ter me dado a oportunidade de estar onde estou.

A minha querida mãe, Eugênia (*In memoriam*), e meu querido Pai, José, por me educarem e nunca ter me deixado faltar nada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, que me permitiu e deu a oportunidade de estar onde tantos outros almejam estar.

Aos meus pais, que me deram um modelo de educação, que permitiu que eu me tornasse quem sou hoje, com senso de honra e bril e também por nunca deixarem faltar nada, nem físico, nem espiritual.

A minha família: tios, tias, avó, primos e primas, por estarem sempre torcendo por mim e pela orientação ao longo da vida.

Ao Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto, pela orientação e principalmente pela paciência em me orientar, bem como as discussões científicas.

Ao meu grande amigo Caio, pelos longos anos de amizade, conselhos, broncas e pelos tererés aos sábados. Agradeço também a Lé e Celso (pais do Caio) pela paciência em aturar a casa sempre cheia de amigos.

A Nely, David e Eduardo, pelos longos anos de amizade como nossos vizinhos, por não pensar duas vezes em ajudar e pelo exemplo de força que são.

Aos Amigos do tempo de graduação: Filipe, João Paulo, Fernando, Calango, Roni, Thaís, Tamara, Moti, Cebolla, Gavassa e muitos outros que fizeram parte desse tempo marcante, obrigado pela amizade e pela ajuda sempre.

Ao Gustavo Palácio (pingado) pela amizade, por me acolher quando cheguei em Araraquara.

Ao Prof. Dr. Lúcio de Almeida, pela amizade, paciência e várias cervejas na Divina Confraria.

As professoras Maria Valnice, Hideko, Pillar, pela ajuda e ensinamentos e exemplo de dedicação.

A todos os alunos do grupo de eletroanalítica, que de uma forma ou de outra ajudaram para a conclusão deste trabalho.

A todos do NDCOM, Graziela, Bianca, Maísa, José Luiz, Milena, Bruna, Paim, Thulio, José Delfino, Tarso, pelas conversas e ensinamentos.

Ao meu amigo Acelino, por sempre ter paciência comigo, pela amizade, por sempre me ajudar quando precisei.

Ao Rodrigo e o Alan, pela amizade e pelas risadas no bandeirão.

Aos amigos do GFQM (Aline, Bianca, Matão, Doug, Jojó, Bruno, Rodrigo e Pingado) que estenderam a mão quando eu não tinha amigos aqui e pelos cafés e risadas.

E especialmente aos amigos da república Xurupitas e agregados: Jatobá, Pelé, Chucky, Gota, Roberth, William, Tonhão, Husky, Tiago Varão, Juliana, Fabi, Batera pelos momentos de descontração, pela amizade e pelas risadas.

Ao LMA-IQ pela disponibilidade da utilização do microscópio eletrônico de varredura.

A Capes, pelo apoio financeiro durante todo o tempo do mestrado.

“Você não pode ter sempre o que quer. Mas, se você tentar algumas vezes, você consegue o que precisa.”

Rolling Stones.

RESUMO

O óleo fúsel é o co-produto da destilação do etanol e é formado pela mistura de álcoois superiores (álcoois com mais de 3 carbonos), ésteres, aldeídos, entre outros. O volume de óleo fúsel produzido em média é 2,5 L de óleo fúsel por 1000 L de etanol, sendo utilizado como combustível nas caldeiras das usinas, bem como precursores de ésteres utilizados em indústrias de cosméticos e em fabricação de plásticos. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sensor eletroquímico (GCE/RGO/AuNP/MIP) baseado em polímeros molecularmente impressos (MIP), utilizando o pirrol (Py) como monômero, contendo nanopartículas de ouro (AuNP) e óxido de grafeno reduzido (RGO) para a determinação do álcool isoamílico, um dos componentes do óleo fusel. Foram realizados estudos eletroquímicos, como estudo de velocidade de varredura, para determinar reversibilidade do sistema e diagnosticar o controle do processo eletródico. Após os estudos eletroquímicos, foram realizadas caracterização morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura com Canhão de Emissão de Elétrons com efeito de campo (MEV-FEG) e caracterização eletroquímica por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS). Após a caracterização, foi avaliada a performance analítica do sensor GCE/RGO/AuNP/MIP, utilizando um intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ até $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, encontrando um limite de detecção de $8,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Foi determinada a concentração de álcool isoamílico em amostra de óleo fúsel pelo método de adição de padrão e o valor encontrado foi de $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O método foi validado através de ensaio de recuperação, mostrando que o sensor desenvolvido é promissor para a utilização em determinação de álcool isoamílico em óleo fúsel.

Palavras chave: Óleo fúsel. Óxido de grafeno. Nanopartículas de ouro. Polímeros molecularmente impressos.

ABSTRACT

The fusel oil is co-product of the distillation of ethanol and is formed by the mixture of higher alcohols (alcohols having more than 3 carbons) esters, aldehydes, etc. The volume of fusel oil produced on average is 2.5 L fusel oil by 1000 L of ethanol, used as fuel in the boilers of the plants, as well as esters of precursors used in the cosmetics and plastics manufacturing. This study aimed to develop an electrochemical sensor (GCE/RGO/AuNP/MIP) based on molecularly imprinted polymers (MIP), using pyrrole (Py) as the monomer, containing gold nanoparticles (AUNP) and reduced graphene oxide (RGO) for determining the isoamyl alcohol, one of fusel oil components. They were conducted electrochemical studies, such as study of scanning speed, to determine system reversibility and diagnose the control of the electrode process. After the electrochemical studies were conducted morphological caractrizacão by Scanning Electron Microscopy with Electrons Emission Cannon with field effect (SEM-FEG) and electrochemical characterization by spectroscopy Electrochemical Impedance (EIS). After the characterization, the analytical performance of the GCE/RGO/AuNP/MIP sensor was evaluated using a concentration range of 1.0×10^{-7} to 1.0×10^{-4} mol L⁻¹, encountering a detection limit 8.2×10^{-8} mol L⁻¹. Was determined the concentration of isoamyl alcohol in a sample of fusel oil by standard addition method and the value found was 1.6×10^{-4} mol L⁻¹. The method was validated by recovery test, showing that the sensor is designed promising for use in determining isoamyl alcohol fusel oil.

Keywords: Fusel oil. Graphene oxide. Gold nanoparticles. Molecularly imprinted polymers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuNP – Nanopartículas de Ouro

BDD – Diamante dopado com boro (do inglês “Boron-doped diamond”)

CNT – Nanotubos de Carbono (do inglês “Carbon nanotubes”)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês “Differential Pulse Voltammetry”)

EIS – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do inglês “Electrochemical Impedance Spectroscopy”)

FEG - Canhão de Emissão de Eletrons com efeito de campo (do inglês “Field Electron Gun”)

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês “Glassy Carbon Electrode”)

GCE/RGO/AuNP/MIP – Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido, contendo nanopartículas de ouro e polímeros molecularmente impressos.

GR – Grafeno

ITO – Óxido de estanho e índio (do inglês “Indium Tin Oxide”)

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

MIP – Polímeros Molecularmente Impressos (do inglês “Molecularly Imprinted Polymers”)

MNP – Nanopartículas Metálicas

NIP – Polímero não impresso (do inglês “Nonimprinted polymer”)

RGO – Óxido de Grafeno Reduzido (do inglês “Reduced Graphene Oxide”)

LISTA DE SÍMBOLOS

A – Área do eletrodo

C – Concentração

C^*_0 – Concentração no seio da solução

CV – Coeficiente de variação

D_0 – Coeficiente de difusão

E_{pa} – Potencial de pico anódico

E_{pc} – Potencial de pico catódico

I_{pa} – Corrente de pico anódico

I_{pc} – Corrente de pico catódico

n – Número de elétrons

R^2 – Coeficiente de correlação linear

s – Inclinação da reta

S/N – Sinal/Ruido

SD – Desvio padrão

ΔI – Diferença entre corrente do branco e corrente do sinal desejado

v – Velocidade de varredura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Óleo Fúsel	12
1.2 Métodos de determinação de óleo fusel.	14
1.3 Sensores eletroquímicos.....	15
1.2.1 <i>Grafeno.</i>	16
1.2.2 <i>Nanopartículas metálicas.</i>	17
1.2.3 <i>Polímeros molecularmente impressos.</i>	17
2 OBJETIVOS	19
3 PARTE EXPERIMENTAL:	20
3.1 Reagentes e soluções.....	20
3.2 Instrumentação.....	20
3.3 Procedimento experimental.	21
3.3.1 <i>Comportamento eletroquímico do álcool isoamílico em eletrodo de ouro.</i>	21
3.3.2 <i>Preparação do do sensor GCE/GR/AuNP/MIP.....</i>	21
3.3.3 <i>Caracterização do sensor GCE/GR/AuNP/MIP.....</i>	22
3.3.4 <i>Determinação do álcool isoamílico.</i>	23
3.3.5 <i>Determinação do álcool isoamílico em amostra real de óleo fúsel.</i>	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES:.....	24
4.1 Comportamento eletroquímico do álcool isoamílico em eletrodo de carbono vítreo.	24
4.2 Comportamento do álcool isoamílico eletrodo de ouro.	25
4.3 Comportamento do álcool isoamílico em eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e óxido de grafeno reduzido.....	28
4.4 Desenvolvimento do sensor GCE/GR/AuNP/MIP	30
4.5 Desenvolvimento do método de determinação do álcool isoamílico.....	31
4.5.1 <i>Variação da concentração de pirrol.</i>	32
4.5.2 <i>Estudo da variação da concentração do álcool isoamílico.</i>	33
4.5.3 <i>Estudo do tempo da remoção do “template”.....</i>	34
4.5.4 <i>Estudo do tempo de incubação do “template”.</i>	35
4.6 Estudo da variação da velocidade de varredura.	35
4.7 Caracterização morfológica.	38
4.8 Caracterização eletroquímica.....	41
4.9 Performance analítica do sensor GCE/GR/AuNP/MIP.....	42
4.10 Determinação do álcool isoamílico em amostra de óleo fúsel.....	44
5 CONCLUSÕES:.....	46

REFERÊNCIAS.....	47
------------------	----

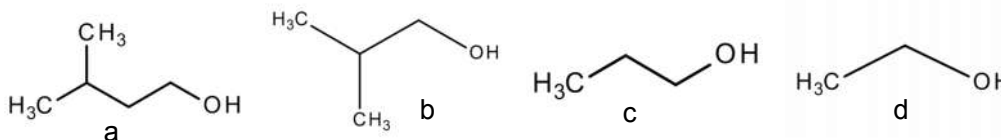
1 INTRODUÇÃO

1.1 Óleo Fúsel

A necessidade de fontes de energias renováveis e limpas tem sido amplamente pesquisada e fomentada no intuito de se diminuir os poluentes gerados pelos veículos automotores, uma vez que o petróleo é uma fonte de energia não renovável e, além do mais, os níveis de poluição alcançados com o uso destes combustíveis são preocupantes. A produção de etanol combustível no Brasil data do ano de 1975 com o surgimento do programa Pró-Álcool, visando reduzir a dependência da importação do petróleo(1). Desde então, a produção de etanol tem crescido nos últimos anos, não só visando suprir a demanda do país, mas também visando a economia nacional, uma vez que o etanol é exportado. Com o aumento da produção, a geração dos resíduos da cana de açúcar aumentou significativamente, dentre os resíduos, estão o bagaço da cana, a vinhaça e o óleo fúsel.

O óleo fúsel é conhecido como o co-produto da destilação do etanol e contém entre vários compostos, álcoois de grande massa molecular, que podem ser chamados de álcoois superiores tais como álcool isoamílico (3-metil-1-butanol), isobutílico (2-metil-1-propanol) e n-propílico. As estruturas desses álcoois são mostradas na Figura 1.

Figura 1 - Formulas estruturais. (a) álcool isoamílico; (b) álcool isobutílico; (c) propanol e (d) etanol.



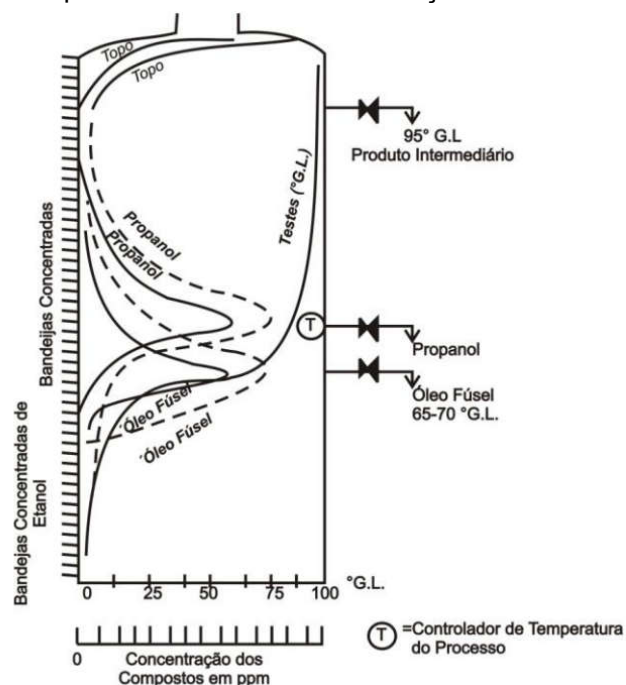
Fonte: Elaborado pelo autor.

O termo óleo fúsel (Finkel) teve origem na Alemanha e referia-se às frações ruins e inferiores. Nos dias atuais, refere-se às misturas de álcoois superiores nas várias etapas da destilação do etanol(2).

O óleo fúsel é formado durante a fermentação alcoólica e é a fração menos volátil obtida durante o processo de destilação do etanol, consistindo em um líquido amarelo viscoso e pouco solúvel em água composto de mistura de ésteres, aldeídos, ácidos carboxílicos, sendo que a maior fração é composta pelos alcoóis superiores: álcool isoamílico, álcool isopropílico e álcool n-propílico.

A quantidade e a qualidade do óleo fúsel dependem do método de preparação do caldo para a fermentação e das condições experimentais utilizadas no processo(3). A presença destes álcoois superiores no etanol gerado, reduz a qualidade do produto final. O óleo fúsel em si não tem utilização como solvente, por ser uma mistura de vários compostos, daí a necessidade de separar os álcoois superiores(4,5). Os álcoois encontrados no óleo fúsel tem ampla aplicação na indústria, como reagentes de partida para a produção de ésteres, utilizados na indústria alimentícia, plásticos, solventes para vernizes e fixadores em perfumaria. Segundo Küçük e colaboradores(4) os álcoois superiores são aqueles que contem principalmente de 3 a 5 átomos de carbono em sua estrutura, tendo uma massa molecular maior e um maior ponto de fusão e ebulição. A separação do óleo fusel é obtida através das variações de concentração de etanol na coluna retificadora. Quando a concentração de etanol é maior que a concentração de óleo fúsel, a volatilidade do óleo fusel diminui em relação à do etanol. De forma contrária, quando a concentração de etanol é menor que a concentração de óleo fusel, este se torna o componente mais volátil, tendendo a permanecer na região superior da coluna, região que a concentração varia entre 40 a 47%(2,5). A Figura 2 ilustra a distribuição dos subprodutos na coluna de retificação(6).

Figura 2 - Distribuição dos subprodutos na coluna de retificação.



Fonte: Ferreira et al.(6)

1.2 Métodos de determinação de óleo fúsel.

Os métodos para a determinação dos componentes do óleo fúsel encontrados na literatura são predominantemente cromatográficos. Perez et al(7) realizaram a quantificação dos componentes do óleo fúsel por cromatografia gasosa para os álcoois e ésteres e cromatografia líquida para os compostos carbonílicos, utilizando amostras de óleo fúsel 3 usinas diferentes. Foram encontrados em altas quantidades os álcoois isoamílico (390 g L^{-1}), isobutílico (158 g L^{-1}), etílico ($28,4 \text{ g L}^{-1}$), metílico ($16,6 \text{ g L}^{-1}$) e n-propílico ($11,9 \text{ g L}^{-1}$), sendo que, estes compostos representam aproximadamente 77% da composição do óleo fúsel. Neale(8) utilizou a cromatografia líquida de alta eficiência para determinar etanol, álcool isoamílico, álcool isobutílico e 1-propanol em bebidas alcoólicas. Não foi encontrado na literatura nenhum método de análise dos componentes do óleo fúsel utilizando de técnicas eletroquímicas diretas, salvo por técnicas hífenadas, como descrito por LaCourse e Johnson(9), que realizaram a detecção de vários álcoois alifáticos por cromatografia líquida utilizando

detecção amperométrica pulsada, utilizando como eletrodo de trabalho ouro e platina em meio ácido e básico. Os métodos cromatográficos de análise implicam em desvantagens como o alto custo de manutenção, tempo de análise e preparação de amostra.

Dessa maneira, sensores eletroquímicos são uma alternativa de análise, pois sua construção é de baixo custo, não há a necessidade do preparo da amostra, a possibilidade da análise *in situ*, o aumento da seletividade e baixos limites de detecção.

1.3 Sensores eletroquímicos.

Sensores eletroquímicos constituem um dos quatro transdutores principais de sensores químicos (massa, ótico, térmico e eletroquímico), os quais são dispositivos que traduzem uma resposta química em um sinal elétrico (mensurável), que discrimina o sinal do analito do seu ambiente imediato (eletrólito de suporte)(10,11). Existem três tipos principais de sensores eletroquímicos: amperométricos, potenciométricos e condutométricos. Sensores amperométricos utilizam o potencial aplicado entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho, reduzindo ou oxidando espécies eletroativas sendo a corrente gerada registrada. Nos sensores potenciométricos, um equilíbrio local é estabelecido na interface do sensor, sendo os potenciais do eletrodo ou de membrana medidos, e as informações sobre a composição de uma amostra obtidas a partir da diferença de potencial entre dois eletrodos. Os sensores condutométricos baseiam-se na medida da condutividade em diferentes frequências.(10)

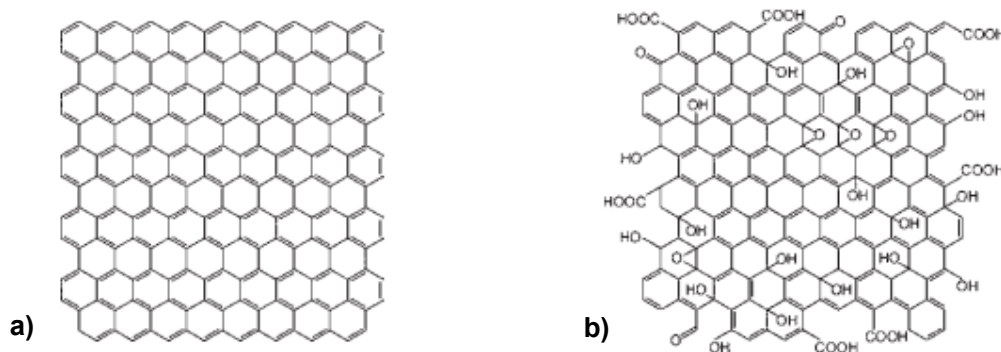
Os sensores são eletroquímicos, geralmente, construídos utilizando substratos (eletrodos), tais como óxido de estanho e índio (ITO)(12), Carbono vítreo (GC)(13), diamante dopado com boro (BDD)(14), Ouro(15) e Platina(16). Para propósitos eletroanalíticos, eletrodos quimicamente modificados, são uma ferramenta poderosa no sentido de melhorar a detectabilidade e seletividade, frente aos eletrodos convencionais, realizando uma modificação da superfície do eletrodo, a qual governa sua propriedade eletroquímica. Tal manipulação da composição molecular do eletrodo tem por objetivo melhorar a sensibilidade, seletividade e/ou a

estabilidade, a fim de satisfazer as necessidades de análise (17). Dentre os modificadores, são utilizados, polímeros condutores(18,19), enzimas(20,21), complexos metálicos(22,23), grafenos (GR)(24,25), nanopartículas metálicas (MNP)(26,27), nanotubos de carbono (CNT)(28,29), polímeros molecularmente impressos (MIP)(30), entre uma grande variedade de modificadores.

1.2.1 Grafeno.

O grafeno é um material constituído por uma monocamada de átomos de carbono de um átomo de espessura firmemente empacotada em uma malha tipo colmeia bidimensional. Foi descoberto por Geim e Novoselov no ano de 2004(31) e apresenta altas propriedades óticas, elétricas e mecânicas e tem sido empregado em diversas áreas , devido suas notáveis propriedades. Uma das áreas onde o grafeno tem sido amplamente utilizado é em química eletroanalítica, sendo empregado como modificador de superfície, devido sua alta área superficial, bem como sua propriedade elétrica. Entretanto, o grafeno é pouco solúvel em água e para fins eletroanalíticos, onde o meio mais comum é o aquoso seu uso direto se torna pouco viável. A saída para o emprego do grafeno é a oxidação do grafite, como propôs Hummers(32), gerando o óxido de grafeno, solúvel em água. A redução do óxido de grafeno é necessária para convertê-lo na espécie condutora, o grafeno. A estrutura do grafeno é mostrada na Figura 3.

Figura 3: Estruturas do (a) óxido de grafeno reduzido e (b) óxido de grafeno.



Fonte: FURUKAWA, K; UENO, Y (33)

A figura 3a sugere que os átomos de carbono estão hibridizados em sp^3 na folha do óxido de grafeno, e a Figura 3b, que os átomos de carbono estão hibridizados em sp^2 , que confere a boa condutividade elétrica(34), devido ao orbital p estar desocupado, favorecendo a passagem de eletrons. A vantagem de se obter o grafeno reduzido eletroquimicamente a partir o óxido de grafeno é a possibilidade de trabalhar em meio aquoso, além de ser mais rápido e limpo(35), uma vez que existe outra rota de obtenção de grafeno, a partir do óxido de grafeno que é a redução com borohidreto de sódio(36) e hidrazina(37) os quais são agente redutores extremamente agressivos. Algumas aplicações do óxido de grafeno reduzido como modificador são a detecção simultânea de catecol e hidrquinona(38,39), detecção de acetaminofeno(40) e a detecção de dopamina em presença de ácido ascórbico(41).

1.2.2 Nanopartículas metálicas.

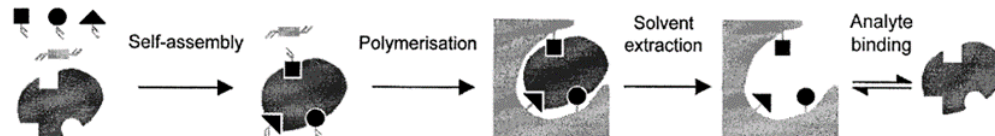
Nos últimos anos o estudo de materiais em nano escala tem sido extenso, particularmente sobre nanopartículas metálicas. A importância de materiais nano particulados em eletroanálise são devidas suas propriedades muito específicas as quais podem ser exibidas em nanoescala, mas que tipicamente não correspondem ao material em uma maior escala. Essas propriedades são a difusão esférica, ao invés de linear em nanopartículas menores, alta área superficial ativa, seletividade, atividade catalítica melhorada, maior relação sinal-ruído e propriedades óticas únicas(42). Na literatura, são encontrados trabalhos onde nanopartículas metálicas são aplicadas em eletroanálise para determinação de uma gama de analitos. Entre estas, podem ser citados a determinação de pesticidas(43), determinação de células cancerosas(44), de traços de mercúrio(45), de metanol(14) entre outros.

1.2.3 Polímeros molecularmente impressos.

Polímeros molecularmente impressos são materiais sintéticos que são preparados por co-polimerização, em solvente porogênico, de um monômero funcional e um monômero de reticulação e um “template”. O “template” pode ser

similar à molécula alvo ou a molécula alvo em si – o analito – que o polímero deveria reconhecer subsequentemente. Durante a síntese do MIP, em primeiro lugar, os monômeros carregam funcionalidades adequadas e moléculas de “template” são preorganizadas em solução, isto é, automontadas, de modo a formar um complexo, em virtude de interações covalentes ou não covalentes de acordo com suas funcionalidades de ligação complementar. Estes complexos são preservados durante a formação da rede de polímero reticulado e após a remoção subsequente do molde, as cavidades moleculares complementares em tamanho, forma, e orientação de seus sítios de ligação aos do modelo são deixados na rede polimérica (46). A Figura 4 ilustra as etapas de formação convencional do MIP .

Figura 4 - Diagrama das etapas de formação do MIP.



Fonte: Haupt, Mosbach(47).

Existem também os MIPs formados por eletropolimerização, onde não há a adição de monômeros de reticulação e solvente porogênico, apenas uma mistura com a solução do monômero e a solução do template e aplicado um potencial característico de polimerização dependendo do monômero.

Devido suas propriedades altamente notáveis, os MIPs como modificadores de eletrodos tem sido amplamente aplicados em eletroanalítica para a detecção de vários tipos de analitos, tais como eritromicina(48), quercetina(49), carbofurano(50), dibutil ftalato(51) e ácido úrico(52) podem ser citados como alguns exemplos encontrados na literatura.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver um sensor eletroquímico baseado em polímeros molecularmente impressos (MIP), utilizando o polipirrol (Ppy) como MIP, contendo nanopartículas de ouro (AuNP) em óxido de grafeno reduzido (RGO), para a determinação de álcool isoamílico em óleo fúsel.

Os objetivos específicos são estabelecer as condições da preparação dos MIPs, remoção dos “templates”, caracterização morfológica e eletroquímica, desenvolver o método, a fim de alcançar um limite de detecção adequado, bem como a robustez e reprodutibilidade do sensor, validar o método desenvolvido por ensaio de recuperação e aplicar os sensores construídos em amostra real de óleo fúsel, coletado nas usinas da região de Araraquara – SP

3 PARTE EXPERIMENTAL:

3.1 Reagentes e soluções.

Os experimentos foram conduzidos com reagentes de pureza analítica e as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (sistema Milli-Q®, Millipore). Álcool isoamílico, álcool isobutílico foram adquiridos da Acros Orgânicos; sulfato de sódio, pirrol, propanol, óxido de grafeno, ácido acético e ácido cloráurico foram adquiridos da Sigma-Aldrich; ferricianeto de potássio foi adquirido da Qhemis e Hidróxido de sódio, fosfato monobásico e dibásico de sódio utilizados foram adquiridos da Synth.

3.2 Instrumentação

Todas as medidas eletroquímicas foram conduzidas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30, conectado a um microcomputador e controlado pelo software NOVA 1.11, usando uma célula eletroquímica convencional de 3 eletrodos: referência de Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹), eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de trabalho de carbono vítreo, com diâmetro de 3 mm. Foi igualmente utilizado um eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho em experimentos complementares.

As imagens de microscopia foram realizadas com um microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de elétrons com efeito de campo (MEV-FEG) da marca Jeol, modelo JSM 7500F do Laboratório de Microscopia Avançada, do Instituto de Química, Campus de Araraquara.

3.3 Procedimento experimental.

3.3.1 Comportamento eletroquímico do álcool isoamílico em eletrodo de ouro.

Os estudos foram conduzidos em meio de NaOH 0,1; 0,5 e 1 mol L⁻¹ como eletrólito de suporte, sendo utilizadas diversas concentrações de álcool isoamílico. Primeiramente, o eletrodo foi submetido a uma limpeza eletroquímica, pelo método de varreduras sucessivas de potencial em meio de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, em um intervalo potencial de 0,5 a 1,2 V por 30 ciclos a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Após a limpeza, o eletrodo foi submetido a varreduras sucessivas de potencial em meio de NaOH, em um intervalo de potencial de -0,1 a 1,3 V por 30 ciclos a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Após essa etapa, foi adicionado no mesmo sistema, 1 mL de álcool isoamílico no mesmo intervalo de potencial aplicado anteriormente em meio de NaOH.

3.3.2 Preparação do sensor GCE/GR/AuNP/MIP.

Primeiramente, foi preparada dispersão de óxido de grafeno em 0,2 mol L⁻¹ de sulfato de sódio, partindo de uma solução concentrada de 4 mg mL⁻¹, sendo diluída para uma concentração de 0,5 mg mL⁻¹ e posteriormente a solução foi submetida a um banho de ultrassom por 4 horas, como proposto por Wen et al.(53). Para a redução e eletrodeposição do óxido de grafeno, foi utilizada a técnica de cronoamperometria, com um potencial de -1,5 V por 1200 s, retirado da solução de eletrodeposição e lavado com água deionizada.

Após a modificação do eletrodo com óxido de grafeno reduzido, a modificação do eletrodo com AuNP foi realizada, baseada no método proposto por Zhang et al.(43), onde foi preparada uma solução de ouro partindo de uma solução estoque (2,9x10⁻³ mol L⁻¹) diluída para uma concentração de 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ de HAuCl₄. A deposição das AuNP foram realizadas por voltametria cíclica, em uma faixa de potencial de 1,3 a -0,05 V, a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ por 25 ciclos, retirado da solução de eletrodeposição e lavado com água deionizada.

Após a modificação com as AuNP, o eletrodo GCE/RGO/AuNP foi modificado com o MIP, onde foi imerso em uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de pirrol em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ em um pH 3,6 e uma solução de álcool isoamílico de 1,0×10⁻³ mol L⁻¹. A eletropolimerização do MIP foi realizada por duas técnicas eletroquímicas: voltametria cíclica e cronoamperometria. Na eletropolimerização por voltametria cíclica, foi adicionado 5,0×10⁻³ L da solução contendo pirrol de concentração 0,1 mol L⁻¹ e 5,0×10⁻³ L da solução do álcool isoamílico de concentração 1,0×10⁻³ mol L⁻¹, utilizando um intervalo de potencial de 0 a 0,8 V, uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ por 6 ciclos, como proposto por Wang et. al.(54). Na eletropolimerização por cronoamperometria, as proporções e concentrações de pirrol e álcool isoamílico foram as mesmas, sendo aplicado potencial de 0,75 V por 120 s, como descrito por Pei et al.(55). Para comparação, foi desenvolvido um eletrodo com NIP, polímero não impresso, ou seja, sem a adição do “template”. Sendo assim, o sensor com NIP foi construído em condições semelhantes ao MIP, porém sem a adição do álcool isoamílico.

Após a construção do sensor GCE/RGO/AuNP/MIP, foi feita a remoção do “template” para a avaliação da performance do sensor e a determinação do álcool isoamílico. A remoção do “template” foi feita mergulhando o eletrodo em uma mistura de acetonitrila e ácido acético concentrado em uma proporção de 5:1 (v/v) por 2 minutos, retirado da solução e lavado com água deionizada. A etapa posterior foi observar o tempo de incubação do “template” nos respectivos espaços deixados no MIP após a remoção do “template” e para isso o sensor foi introduzido em uma solução de álcool isoamílico 1,0×10⁻⁶ mol L⁻¹ por 30 segundos, retirado da solução e lavado com água deionizada.

3.3.3 Caracterização do sensor GCE/RGO/AuNP/MIP.

O sensor GCE/RGO/AuNP/MIP foi submetido a uma série de caracterizações: morfológica e eletroquímica. As imagens de microscopia foram realizadas com um microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de elétrons com efeito de campo (MEV-FEG). Foram utilizadas placas de carbono vítreo com área total de 1,0 cm² e espessura de 0,2 cm.

A caracterização eletroquímica foi realizada utilizando a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS). As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas introduzindo o sensor GCE/RGO/AuNP/MIP em uma solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ em potencial de circuito aberto de 0,225 V em um intervalo de frequência de 1 mHz a 100 kHz.

3.3.4 Determinação do álcool isoamílico.

O procedimento para a construção da curva analítica se deu com a remoção do “template” por 90 s sob agitação. Em seguida o sensor foi lavado com água deionizada e introduzido na cela eletroquímica, onde foi registrado o valor de corrente referente ao “branco”, ou seja, o sensor sem o “template”, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV), utilizando um intervalo de potencial de 0 a 0,6 V com amplitude de modulação de 50 mV, largura de pulso de 50 ms e passo de potencial de 4 mV, em uma solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. A etapa seguinte foi a introdução do sensor em uma solução de tampão acetato de pH 3,6, onde foram feitas adições de diferentes concentrações do álcool isoamílico num intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ sob agitação. A cada adição de concentração, o sensor foi removido da solução, lavado com água deionizada e introduzido na cela eletroquímica e realizada a medida de corrente.

3.3.5 Determinação do álcool isoamílico em amostra real de óleo fúsel.

O óleo fúsel utilizado foi produzido por uma usina de açúcar e álcool da região de Araraquara. Após a coleta, o óleo fúsel foi armazenado em um frasco âmbar e colocado em refrigeração. A amostra não precisou de nenhum tratamento prévio e foi diluída 10.000 vezes.

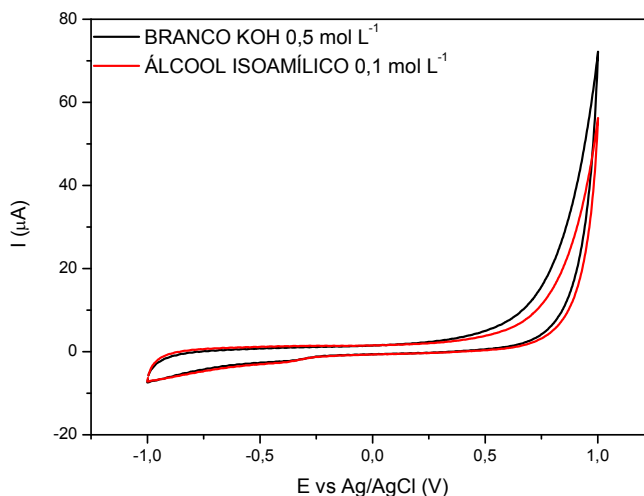
A determinação do álcool isoamílico em amostra de óleo fúsel foi realizado através do método de adição de padrão e o procedimento foi o mesmo relatado no item 3.3.4. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES:

4.1 Comportamento eletroquímico do álcool isoamílico em eletrodo de carbono vítreo.

A fim de observar o comportamento eletroquímico do álcool isoamílico, o mesmo foi submetido a um estudo preliminar, utilizando a técnica de voltametria cíclica em KOH 0,5 mol L⁻¹, em uma faixa de potencial de -1 a 1 V (vs Ag/AgCl) na velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. A Figura 5 mostra os voltamogramas cíclicos somente em eletrólito de suporte, KOH 0,5 mol L⁻¹ e após a adição de 0,1 mol L⁻¹ do álcool isoamílico.

Figura 5: Voltamogramas cíclicos em solução de KOH 0,5 mol L⁻¹ e na presença do álcool isoamílico na concentração de 0,1 mol L⁻¹ em carbono vítreo.



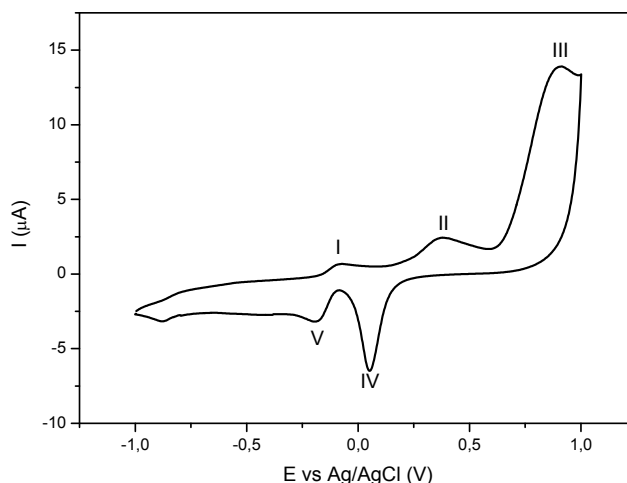
Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar nesta figura que, ao se adicionar o álcool isoamílico, não há nenhum pico anódico ou catódico antes da oxidação da água. Uma proposição para a não oxidação do álcool isoamílico seria o fato da molécula conter apenas um grupo -OH em sua estrutura, requerendo uma energia muito grande (altos potenciais anódicos), bem como o carbono não ser um material adequado para a oxidação dos álcoois em meio alcalino(56).

4.2 Comportamento do álcool isoamílico eletrodo de ouro.

Primeiramente, o eletrodo de ouro foi submetido a uma voltametria cíclica em meio de KOH 1,0 mol L⁻¹, em uma faixa de potencial de -1 a 1 V (vs Ag/AgCl) a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, com posterior adição de 0,1 mol L⁻¹ de álcool isoamílico. A Figura 6 mostra o voltamograma cíclico obtido.

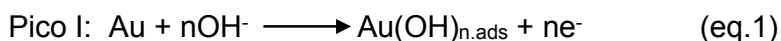
Figura 6: Voltamograma cíclico em KOH 1 mol L⁻¹ em uma faixa de potencial de -1 a 1 V a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ em eletrodo de ouro.



Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 6 mostra claramente tres picos anódicos (I, II e III) e dois picos catódicos (IV e V) para o ouro.

Os picos anódicos podem ser representados pelas equações abaixo:

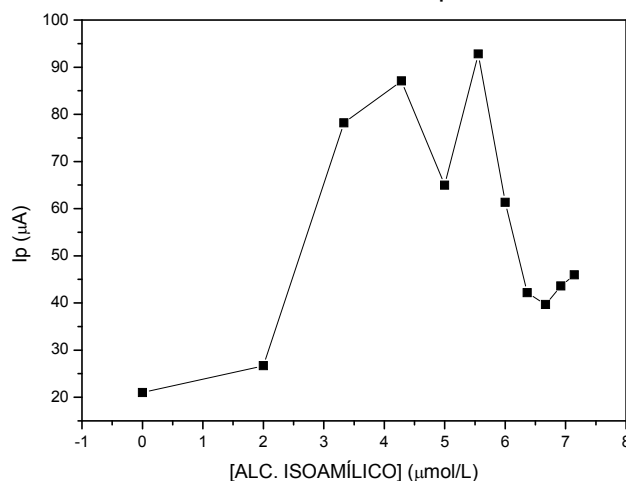


O processo que ocorre no pico I é relacionado a adsorção de íons hidroxila na superfície do eletrodo de ouro, que ocorre aproximadamente em 0,09 V (vs Ag/AgCl) (eq.1) e o processo no pico II é relacionado a formação de óxido, com a perda de um próton para a solução, que ocorre em um potencial aproximado de 0,50 V (vs Ag/AgCl) (eq. 2).

O pico III pode ser assumido como a emersão dos cátions ouro (III) através da monocamada de óxido formada no pico II, que são altamente reativos e ocorre em um potencial aproximado de 0,90 V (vs Ag/AgCl) (eq.3). O alto número de oxidação do cátion favorece a coordenação do excesso dos íons hidroxila(57). O pico IV e V são referentes ao processo inverso dos picos II e I, respectivamente.

O estudo seguinte foi realizado diminuindo se o intervalo de potencial e a adição do álcool isoamílico. Para isso, o eletrodo de ouro foi novamente passivado em eletrólito de suporte, NaOH 0,5 mol L⁻¹ por 30 varreduras sucessivas de potencial de -0,1 a 1,2 V, a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Com o eletrodo passivado, foram adicionados várias concentrações de álcool isoamílico variando de 2,0x10⁻⁶ a 7,1x10⁻⁶ mol L⁻¹ em eletrólito de suporte. Os resultados obtidos desse estudo podem ser observados na Figura 7.

Figura 7: Curva da I_p vs concentração de álcool isoamílico. Intervalo de concentração 2,0x10⁻⁶ a 7,1x10⁻⁶ mol L⁻¹ em eletrodo de ouro. Eletrólito de suporte NaOH 0,5 mol L⁻¹

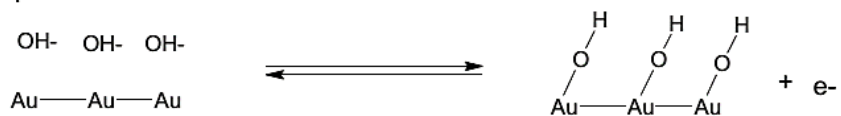


Fonte: Elaborado pelo autor

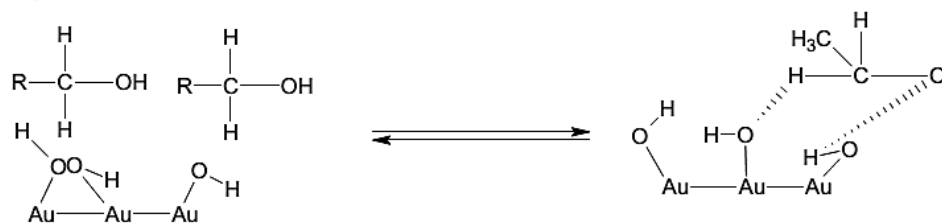
De acordo com a Figura 7, há o aumento da corrente catalítica à medida que se aumenta a concentração de álcool isoamílico até exatamente a concentração de 5,6x10⁻⁶ mol L⁻¹, após esse ponto, a corrente decresce e se mantém sem grandes alterações com o aumento da concentração. Esse comportamento provavelmente pode ser atribuído à adsorção das espécies oxidadas na superfície do eletrodo de ouro, processo qual pode ser ilustrado pela Figura 8, referente ao processo geral de oxidação dos álcoois em eletrodo de ouro.

Figura 8: Mecanismo geral de oxidação dos álcoois.

Etapa 1:



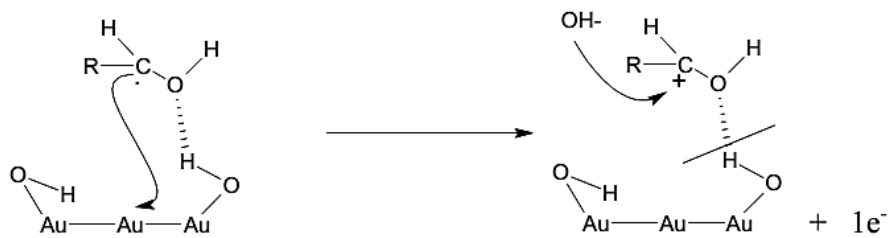
Etapa 2:



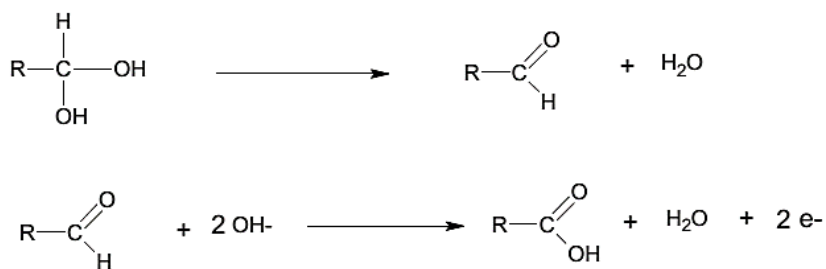
Etapa 3:



Etapas 4 e 5:



Etapa 6:

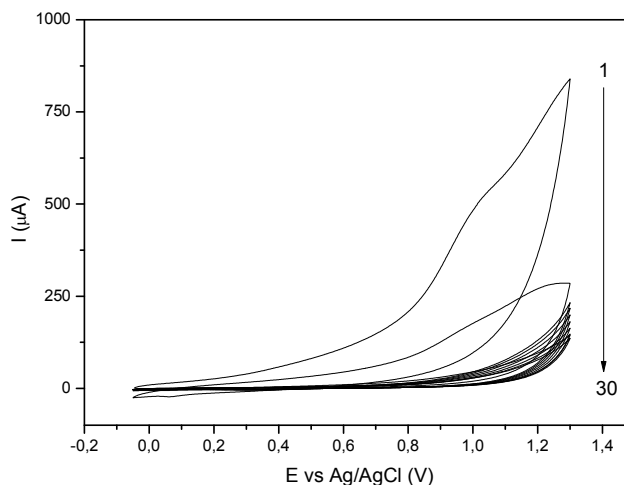


Fonte: Ocón, P.; Alonso, C.; et al., 1986(58).

4.3 Comportamento do álcool isoamílico em eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e óxido de grafeno reduzido.

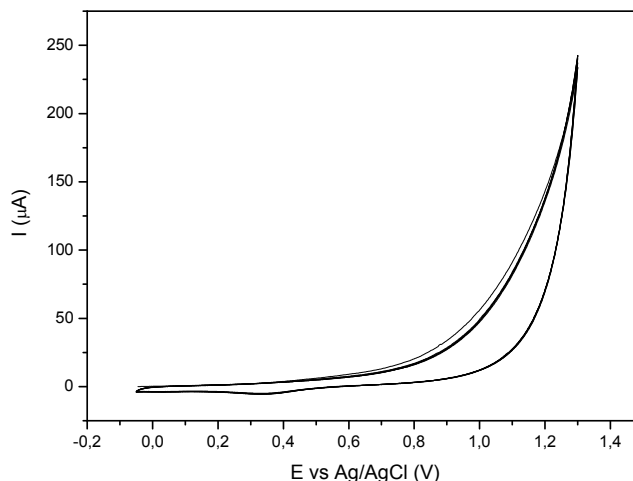
O estudo com o álcool isoamílico frente às nanopartículas de ouro foi realizado a fim de avaliar o comportamento do mesmo em meio básico. Para esse estudo, as nanopartículas de ouro foram eletrodepositadas por meio da voltametria cíclica, em uma faixa de potencial de 1,3 a -0,05 V por 25 ciclos e a uma velocidade de 100 mV s⁻¹. Após a deposição, o eletrodo modificado com as nanopartículas de ouro foi passivado em eletrólito de suporte, NaOH 0,5 mol L⁻¹ por 30 varreduras sucessivas de potencial de -0,1 a 1,2 V, a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ (Figura 9). Com o eletrodo passivado, foi adicionado 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ de álcool isoamílico em eletrólito de suporte. Os resultados obtidos desse estudo podem ser observados na Figura 10.

Figura 9: Voltamogramas da passivação do eletrodo modificado com nanopartículas de ouro em eletrólito de suporte NaOH 0,5 mol L⁻¹, intervalo de potencial de -0,1 a 1,2 V, velocidade de varredura de 50mV s⁻¹.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10: Voltamograma da adição de álcool isoamílico $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito de suporte NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, intervalo de potencial: $-0,1$ a $1,2 \text{ V}$, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .



Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 9 apresenta o voltamograma da passivação das nanopartículas de ouro na superfície do eletrodo de carbono vitreo e indica um decaimento da corrente a cada varredura de potencial. No potencial aproximado de $1,0 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), pode se observar o pico referente à formação do hidróxido de ouro no primeiro ciclo, porém este pico praticamente desaparece nos ciclos seguintes. Não é possível afirmar se todas as nanopartículas se converteram em hidróxido já no primeiro ciclo de potencial, mas é provável que tenha ocorrido a formação da espécie isolante na superfície do eletrodo. Ao se adicionar o analito em eletrólito de suporte, não houve a formação do pico referente a eletrocatalise do álcool isoamílico, como mostra a Figura 10.

Outra explicação plausível é que as nanopartículas de ouro em pH maior que 7 e em potenciais maiores que $1,0 \text{ V}$, há a dissolução das AuNP na superfície do eletrodo e aumentando-se o pH, diminui-se o potencial de dissolução do Au metálico(42).

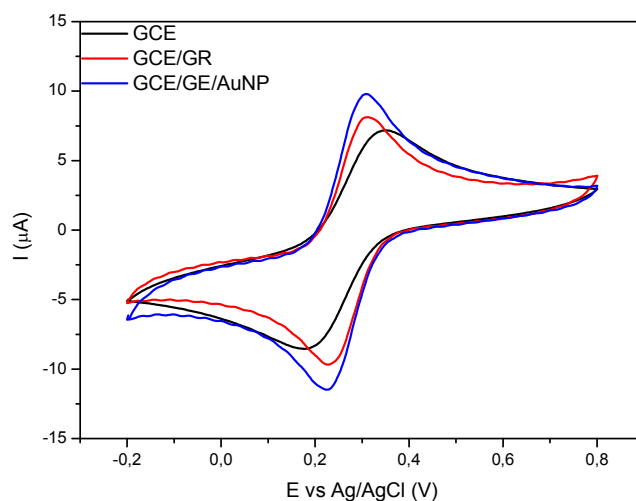
Os estudos relatados acima serviram de base para a construção do sensor com os MIPs, uma vez que, a idéia original seria a detecção direta dos analitos, com base nos resultados satisfatórios de eletrocatalise no eletrodo de ouro. Entretanto, pode se constatar que as nanopartículas de ouro não apresentaram atividade eletrocatalítica para o álcool isoamílico.

4.4 Desenvolvimento do sensor GCE/RGO/AuNP/MIP

Todos os experimentos foram conduzidos utilizando $K_4[Fe(CN)_6]$ como sonda eletroquímica para a determinação do analito no sensor proposto, uma vez que o álcool isoamílico não apresentou resposta eletroquímica frente ao eletrodo modificado com o grafeno reduzido e as nanopartículas de ouro. É comum encontrar na literatura vários trabalhos empregando sonda eletroquímica para a determinação dos analitos de interesse em sensores baseados em MIP, pois alguns analitos não apresentam resposta eletroquímica. Alguns exemplos podem ser citados como a detecção de açúcares indiretamente em um sensor baseado em MIP por Wang et al(30), determinação de hemoglobina bovina por Kan et al(59) e a determinação de D-penicilamina por Lin Li et al(60).

Inicialmente, o eletrodo de carbono vítreo foi modificado com o óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente e em seguida, foi realizada a eletrodeposição das nanopartículas de ouro na superfície do eletrodo. O comportamento esperado com ambas modificações é o aumento das correntes anódicas e catódicas, em relação ao eletrodo de carbono vítreo não modificado. A Figura 11 mostra o voltamograma cíclico das modificações realizadas.

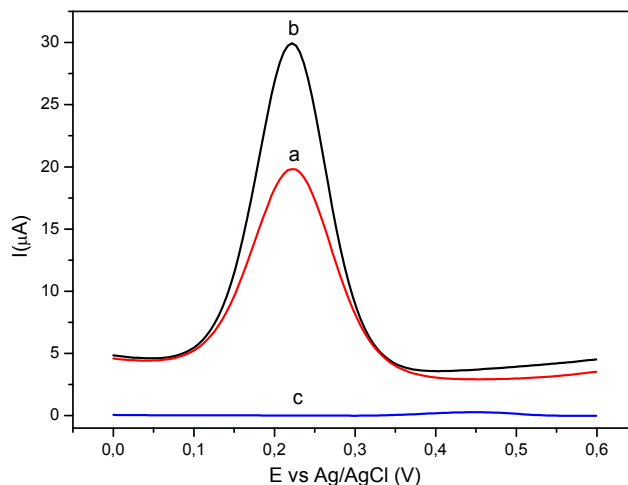
Figura 11: Voltamograma cíclico dos eletrodos modificados com grafeno e nanopartículas de ouro em uma solução. $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .



Fonte: Elaborado pelo autor.

O incremento obtido na Figura 11 é devido provavelmente ao aumento da área ativa do eletrodo. A modificação do eletrodo com MIP foi feita, a fim de checar a resposta eletroquímica do sistema, antes e depois da remoção do “template” por 1 minuto e para comparação, foi feito um eletrodo com NIP, o qual não contém o “template”, apenas para comparação. A Figura 12 mostra o resultado obtido desse estudo.

Figura 12: Voltamograma de pulso diferencial do sensor GCE/GR/AuNP/MIP (a) antes da remoção do “template”, (b) após a remoção do “template” e (c) GCE/GR/AuNP/NIP em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode se observar um ganho de corrente no voltamograma (Figura 12), sugerindo que houve a remoção do “template” e a formação das vacâncias deixadas pelo “template”. Tal comportamento pode ser explicado pelo aumento da corrente anódica, uma vez que o MIP com o “template” (sem nenhuma cavidade) dificulta a difusão das espécies eletroativas até a superfície do eletrodo(30). Tal afirmação pode ser observada na curva c, onde apenas existe o polipirrol, sem o “template”, devido a diferença considerável de corrente quando comparado com a curva a.

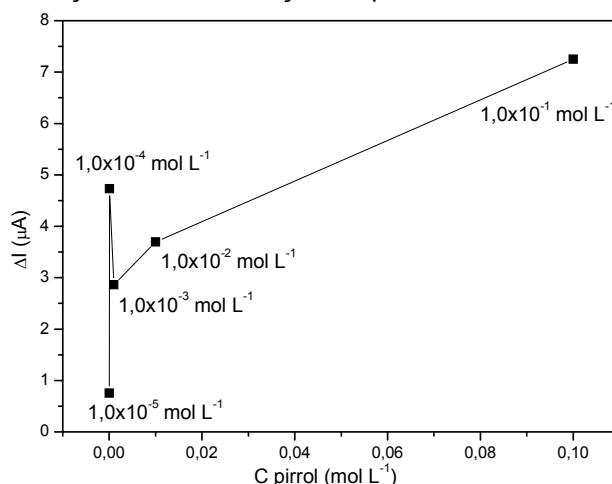
4.5 Desenvolvimento do método de determinação do álcool isoamílico.

Nessa etapa, foram feitas otimizações, tais como concentrações de pirrol e de álcool isoamílico, do tempo de remoção do “template” e do tempo de incubação visando melhora da resposta analítica do sensor.

4.5.1 Variação da concentração de pirrol.

O efeito da concentração do pirrol foi estudada. Sendo realizados experimentos utilizando-se as concentrações de pirrol: $1,0 \times 10^{-1}$, $1,0 \times 10^{-2}$, $1,0 \times 10^{-4}$, e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sendo a concentração de álcool isoamílico fixada em $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A Figura 13 apresenta o efeito da variação da concentração de pirrol. Foi observado que o comportamento do sensor é dependente com a concentração de pirrol. Isso é atribuído à habilidade do monômero de se ligar às moléculas do “template” dependendo do número de cavidades, e em contrapartida, a concentração do monômero deve ser proporcional a espessura do depósito e da quantidade da molécula impressa (“template”) na matriz polimérica(61).

Figura 13: Efeito da variação de concentração de pirrol.



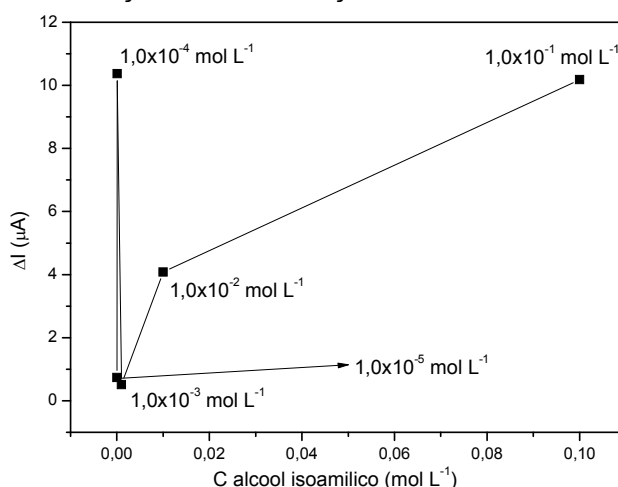
Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base na curva obtida na Figura 13, ao passo que se aumenta a concentração de pirrol, o ΔI aumenta. Isso ocorre pois com o aumento da concentração de pirrol pode causar uma maior velocidade de eletropolimerização, bem como aumentar a quantidade de polímero formado, formando mais impressões moleculares e consequentemente aumentando a sensibilidade do sensor(62). Dessa maneira a concentração de pirrol escolhida foi $1,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹.

4.5.2 Estudo da variação da concentração do álcool isoamílico.

O comportamento do sensor frente a variação do “template” foi estudado, sendo que a concentração de pirrol foi fixada em $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ e a faixa de concentração estudadas foram $1,0 \times 10^{-1}$, $1,0 \times 10^{-2}$, $1,0 \times 10^{-4}$, e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O efeito da variação da concentração do álcool isoamílico pode ser visto na Figura 14.

Figura 14: Estudo da variação da concentração de álcool isoamílico.



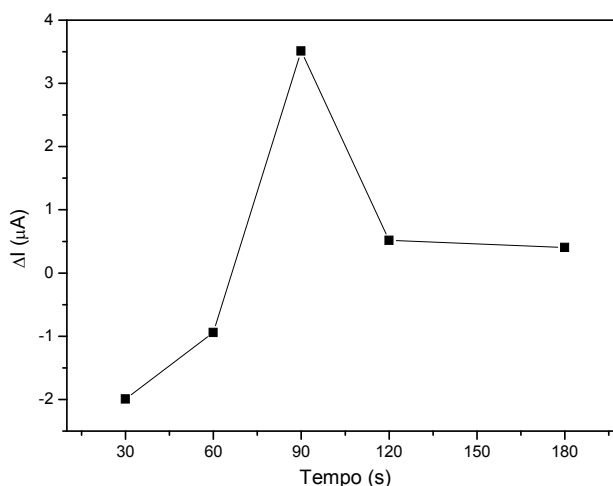
Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se que, com o aumento da concentração de álcool isoamílico, a corrente de pico aumenta ligeiramente. Também pode ser notado dois pontos com alta intensidade de corrente, os quais são $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Com o aumento da concentração do “template”, a quantidade de impressões na rede polimérica também aumenta(61,62), entretanto é necessário manter uma proporção correta entre monômero/“template”, para que a sensibilidade do sensor não seja prejudicada(48). Nesse caso, escolheu-se para os estudos futuros a concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol.

4.5.3 Estudo do tempo da remoção do “template”.

O estudo do tempo de remoção do “template” é um importante parâmetro a ser estudado na construção dos MIPs, pois fornece a informação de “template” que foi removido, através da medida de corrente de pico anódico. Aqui, o sensor foi imerso em uma mistura de acetonitrila/ácido acético 5:1 (v/v) por 30, 60, 90, 120 e 180 segundos sob agitação. Foram medidos os valores de corrente de pico anódico e a curva do efeito da remoção do “template” pode ser construída e é apresentada na Figura 15.

Figura 15: Estudo da remoção do “template”.



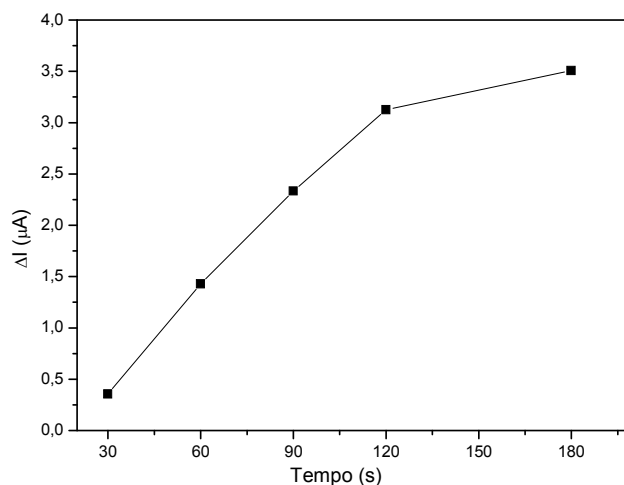
Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar que a corrente de pico aumenta até os 90 segundos e logo depois há um decréscimo na corrente de pico. Esse comportamento sugere que pode haver uma reincubação do “template” previamente removido da rede polimérica, resultando no decréscimo de corrente observado(30), uma vez que a solução de remoção não foi renovada. Sendo assim, o tempo de remoção do “template” escolhido para os estudos futuros foi 90 segundos.

4.5.4 Estudo do tempo de incubação do “template”.

O estudo do tempo de incubação do “template”, bem como o tempo de remoção é de extrema importância para a performance do sensor e foi realizado, no intuito de observar a capacidade de o “template” se religar nas cavidades deixadas após a remoção do mesmo. Após a remoção do “template”, o sensor foi introduzido em 5 mL de uma solução aquosa de álcool isoamílico $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ por 30, 60, 90 e 120 segundos sob agitação. Os resultados obtidos desse estudo são apresentados na Figura 16.

Figura 16: Estudo do tempo de incubação do “template”.



Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar que a resposta do sensor aumenta com o aumento do tempo de incubação, sugerindo que ainda haviam cavidades a serem ocupadas pelo “template”, implicando em uma velocidade de reocupação baixa e alta afinidade do sensor com o “template”(61). O tempo de incubação escolhido para os estudos seguintes foi de 180 s.

4.6 Estudo da variação da velocidade de varredura.

O comportamento eletroquímico do sensor GCE/RGO/AuNP/MIP foi estudado através do estudo de velocidade de varredura em $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻³. O

estudo de velocidade de varredura pode fornecer várias informações a respeito do sistema que está sendo estudado tais como: reversibilidade do sistema, mecanismo do processo eletródico, entre outros. A Figura 17 apresenta os voltamogramas obtidos e a Tabela 1 apresenta os dados obtidos através dos voltamogramas.

Tabela 1 - Dados obtidos através do estudo de velocidade de varredura.

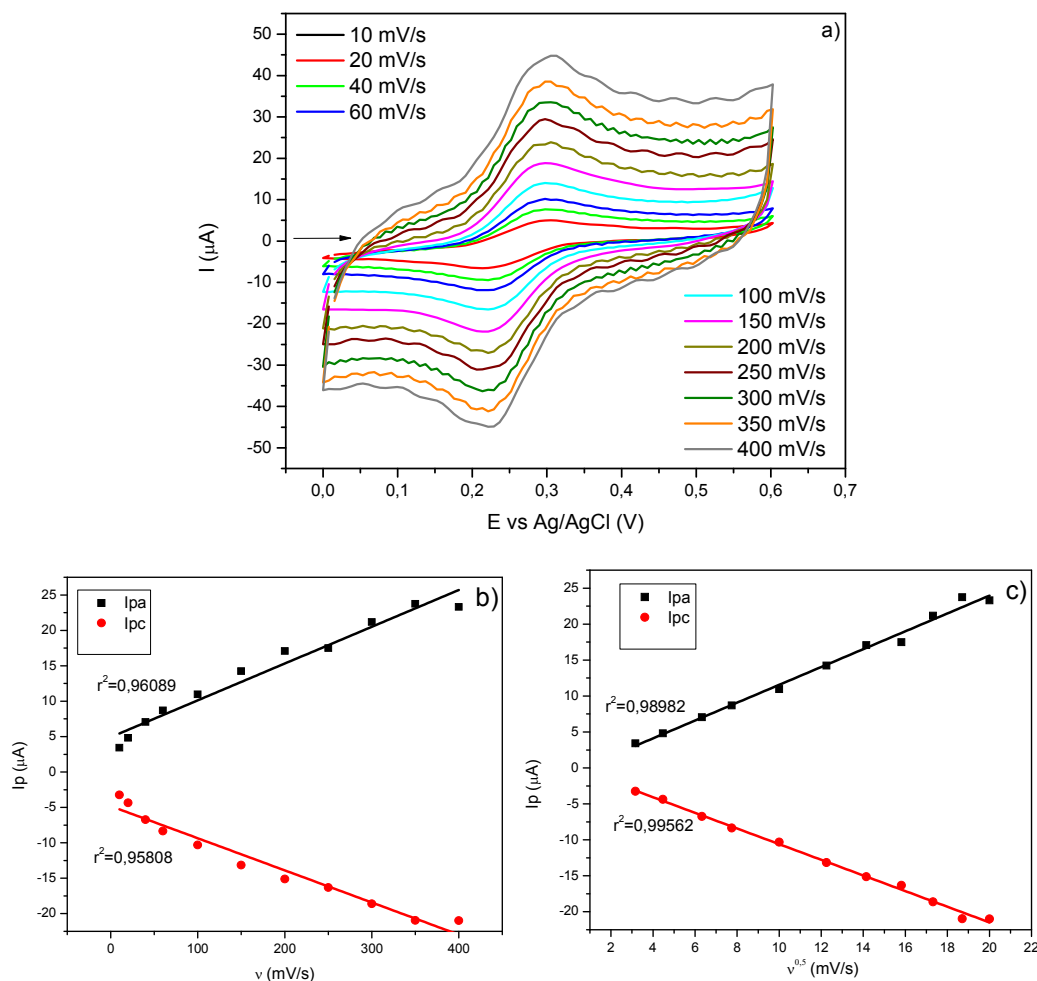
v (mV.s ⁻¹)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	I_{pa} (A)	I_{pc} (A)	I_{pa}/I_{pc}	$ E_{pc}-E_{pa} $ (mV)
10	0,305	0,229	$3,4 \times 10^{-06}$	$-3,3 \times 10^{-06}$	1,05	76
20	0,298	0,221	$4,8 \times 10^{-06}$	$-4,4 \times 10^{-06}$	1,10	76
40	0,298	0,221	$7,0 \times 10^{-06}$	$-6,8 \times 10^{-06}$	1,04	76
60	0,298	0,229	$8,7 \times 10^{-06}$	$-8,4 \times 10^{-06}$	1,04	69
100	0,298	0,229	$1,1 \times 10^{-05}$	$-1,0 \times 10^{-05}$	1,06	69
150	0,290	0,221	$1,4 \times 10^{-05}$	$-1,3 \times 10^{-05}$	1,08	69
200	0,282	0,221	$1,7 \times 10^{-05}$	$-1,5 \times 10^{-05}$	1,13	61
250	0,298	0,237	$1,8 \times 10^{-05}$	$-1,6 \times 10^{-05}$	1,07	61
300	0,290	0,229	$2,1 \times 10^{-05}$	$-1,9 \times 10^{-05}$	1,14	61
350	0,298	0,221	$2,4 \times 10^{-05}$	$-2,1 \times 10^{-05}$	1,13	76
400	0,305	0,229	$2,3 \times 10^{-05}$	$-2,1 \times 10^{-05}$	1,11	76

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 17a estão os voltamogramas para cada velocidade de varredura, começando em 10 mV s⁻¹ até 400 mV s⁻¹. Através dela, é possível observar o aumento das correntes anódicas e catódicas a medida que se aumenta a velocidade de varredura. Com os dados da Tabela 1, foi possível construir as curvas 17b e 17c, a fim de avaliar por qual processo o sistema é controlado. De acordo com a Figura 17b, o eletrodo não apresenta um comportamento linear na relação I_p versus a velocidade de varredura, em contrapartida, pela Figura 17c, a linearidade é comprovada pelo valor de R^2 , indicando que o processo eletródico é controlado por difusão.

Pode se dizer que um sistema é reversível se a razão entre I_{pa} e I_{pc} forem igual a unidade e de acordo com a Tabela 1, para todas as velocidades, a razão é bem próxima a 1, indicando que o sistema é reversível.

Figura 17: a) Estudo de velocidade de varredura. Relação da corrente de pico anódico e catódico versus velocidade de varredura (b) e raiz quadrada da velocidade de varredura (c).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com os dados da tabela 1, também é possível calcular a área ativa do sensor através da equação de Randles-Sevcik(63):

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0^*$$

onde n é o número de elétrons, A é a área do eletrodo em cm^2 ; D_0 é o coeficiente de difusão em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, v é a velocidade de varredura em V s^{-1} e C_0^* é a concentração no seio da solução em mol cm^3 .

A área ativa calculada para o sensor foi de $13,4 \text{ mm}^2$ e a área do eletrodo de carbono vítreo é de $7,1 \text{ mm}^2$.

4.7 Caracterização morfológica.

No sentido de observar a modificação do eletrodo de carbono vítreo, foi realizada caracterização morfológica usando um microscópio eletrônico de varredura, com emissão de elétrons com efeito de campo. A Figura 18 apresenta as microscopias obtidas de quatro estágios distintos.

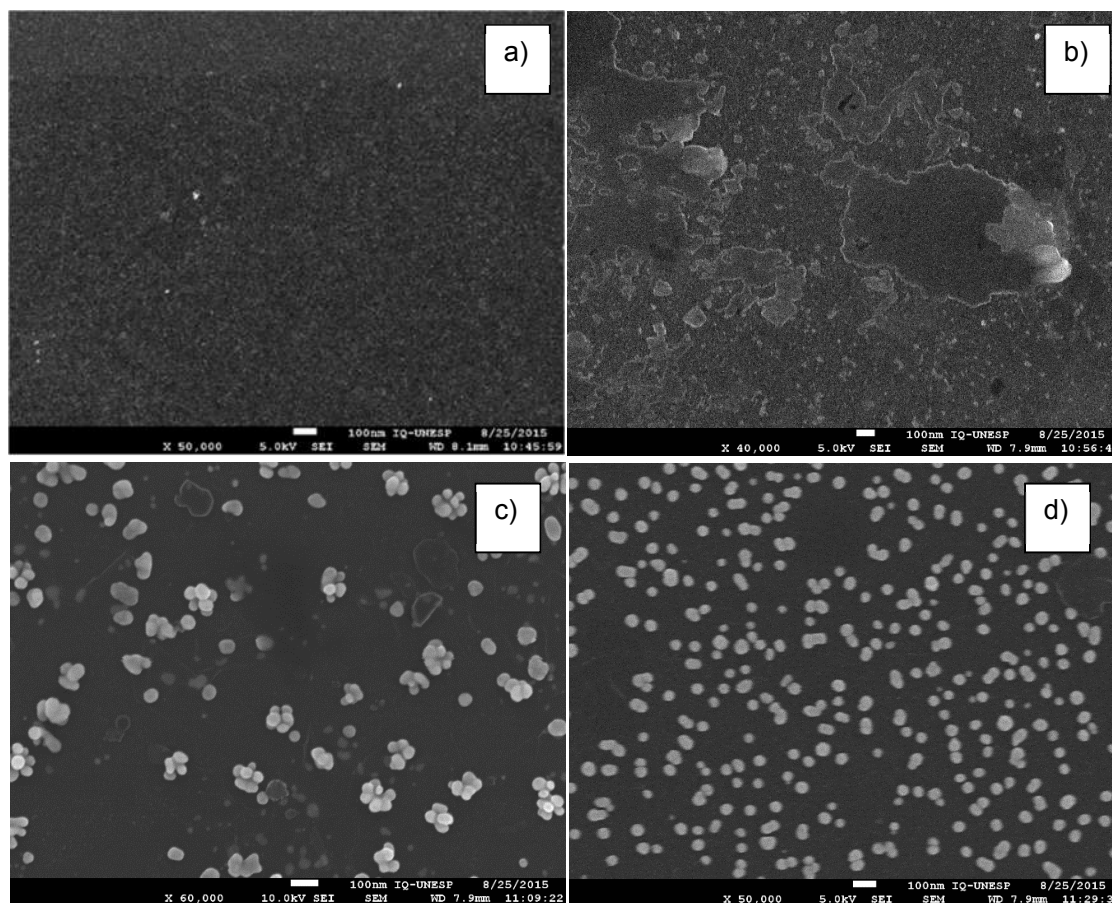
A Figura 18a apresenta a morfologia da superfície do carbono vítreo sem nenhuma modificação e pode-se notar um relevo uniforme. A 18b, mostra a morfologia do carbono vítreo modificado com grafeno. Pode-se notar uma mudança no relevo da superfície de carbono vítreo, inferindo que o grafeno realmente se encontra na superfície.

A Figura 18c mostra a morfologia do carbono vítreo modificado com grafeno e nanopartículas de ouro. Nessa figura, é possível observar que as modificações estão presentes, vide as folhas de grafeno contidas no plano inferior das nanopartículas. Também se pode ver as nanopartículas de ouro dispersas homogeneamente na superfície do substrato, se encontrando aglomeradas entre si ou dispersas.

Por fim, a figura 18d, apresenta as mesmas características da figura anterior, entretanto, não é possível observar com clareza de detalhes as aglomerações das nanopartículas de ouro. Uma outra imagem de MEV foi tirada a fim de observar mais detalhadamente as nanopartículas (Figura 19).

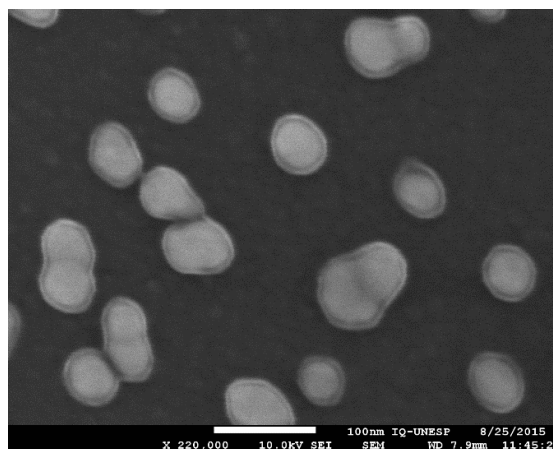
De acordo com a Figura 19, é possível notar que as nanopartículas estão recobertas pelo MIP, como uma fina película(64).

Figura 18: Imagens de MEV de quatro estágios distintos: a) GC sem modificação, magnificação 50.000x; b) GCE/RGO, magnificação 40.000x; c) GCE/RGO/AuNP, magnificação 60.000x e d) CGE/RGO/AuNP/MIP, magnificação 50.000x.



Fonte: Elaborado pelo autor.

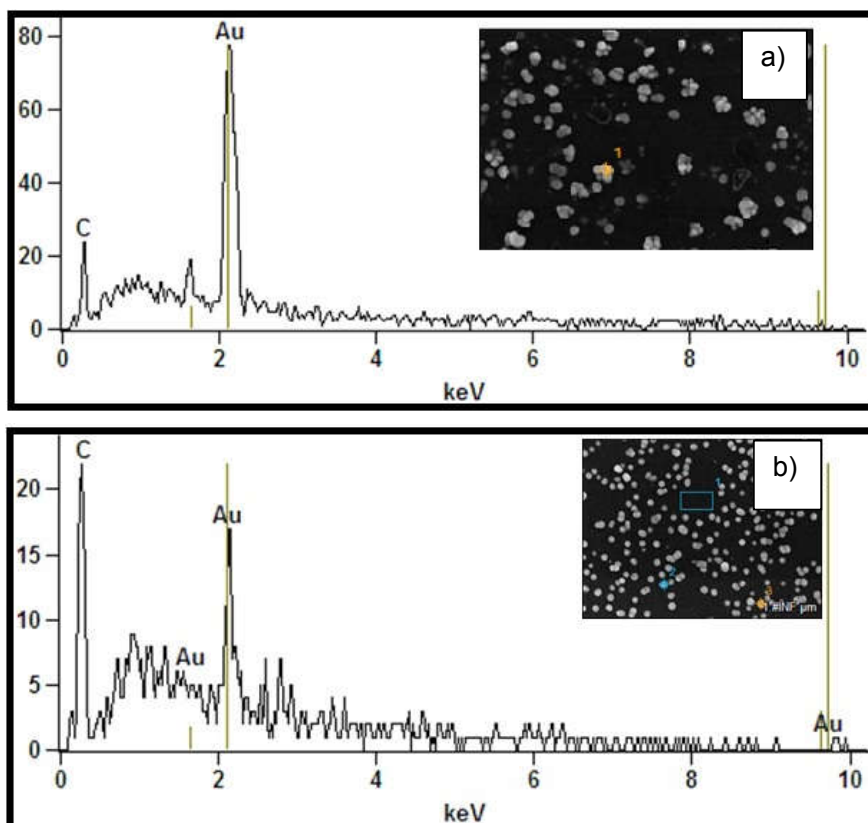
Figura 19: Imagem de MEV de GCE/RGO/AuNP/MIP, com magnificação de 220.000x.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A fim de comprovar as imagens de MEV acima, foram obtidos espectros de raios x por dispersão de energia (EDX) das duas últimas etapas das modificações (Figura 20).

Figura 20: Espectros de EDX para a) GCE/RGO/AuNP e b) GCE/RGO/AuNP/MIP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

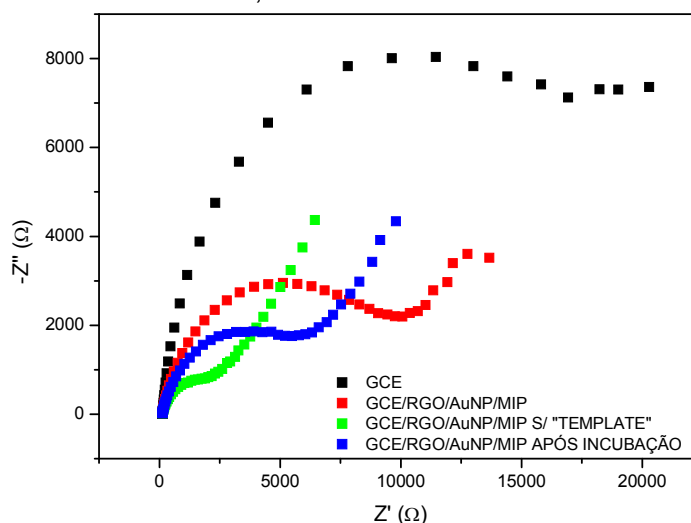
A Figura 20a mostra a presença de ouro, proveniente da nanopartícula e o carbono proveniente do substrato de carbono vitreo e a Figura 20b comprova a presença de ouro e carbono, proveniente tanto do substrato, como do MIP, que como já sugerido acima, está recobrindo as nanopartículas.

4.8 Caracterização eletroquímica

Juntamente com a caracterização morfológica, foi realizada a caracterização eletroquímica do sensor desenvolvido, através da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

A EIS é uma ferramenta eficiente para estudar as propriedades da superfície dos eletrodos modificados. A forma típica de uma espectroscopia eletrônica de impedância inclui uma parte em semi-círculo a altas frequências, que é correspondente com o processo de transferência de elétrons, enquanto a parte linear é correspondente ao processo de transporte de massa(30). O espectro de impedância (Nyquist) obtido é apresentado pela Figura 21.

Figura 21: Espectroscopia de impedância eletroquímica do sensor GCE/RGO/AuNP/MIP em $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em circuito aberto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A curva (a) do espectro acima é referente ao eletrodo de carbono vítreo sem modificação e esta tem uma resistência alta em comparação àquelas curvas com modificação. Esse comportamento é esperado, uma vez que o eletrodo não modificado tem uma área ativa menor do que se estivesse com modificação, o que pode ser observado na curva (b), onde há 3 modificações e todas elas são de natureza condutora. Além da natureza condutora, tais modificações fazem com que a área ativa do eletrodo aumente e diminua a resistência de transferência de carga. Na curva (c), pode se observar a diminuição da resistência de transferência de carga após a

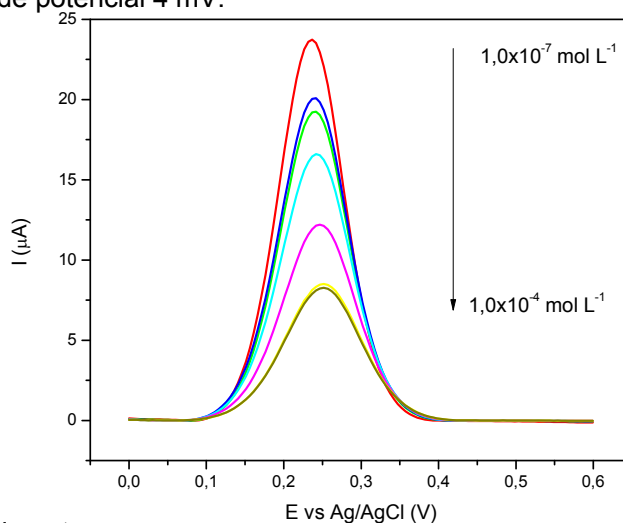
remoção do “template”, em contraste com a observada na curva (d). Essa diferença pode ser atribuída a re-ocupação específica do “template” no MIP, que restringe a transferência de carga entre a sonda redox e a superfície do eletrodo(30).

4.9 Performance analítica do sensor GCE/RGO/AuNP/MIP.

Para avaliar a capacidade de detecção do sensor GCE/RGO/AuNP/MIP, foi utilizada a técnica de voltametria de pulso diferencial, por ser mais sensível do que a voltametria cíclica ou de varredura linear. Os voltamogramas foram registrados e são mostradas na Figura 22. a identificação do analito se faz de forma indireta, utilizando-se de uma sonda, o $K_4[Fe(CN)_6]$ em KCl. O sensor foi imerso em soluções de álcool isoamílico por 2 minutos.

Nos voltamogramas obtidos, pode se observar que as I_p vão diminuindo a medida que se aumenta a concentração do analito. As cavidades formadas vão sendo ocupadas a medida que se aumenta a concentração, diminuindo o sinal de corrente gerado pela a espécie redox(61).

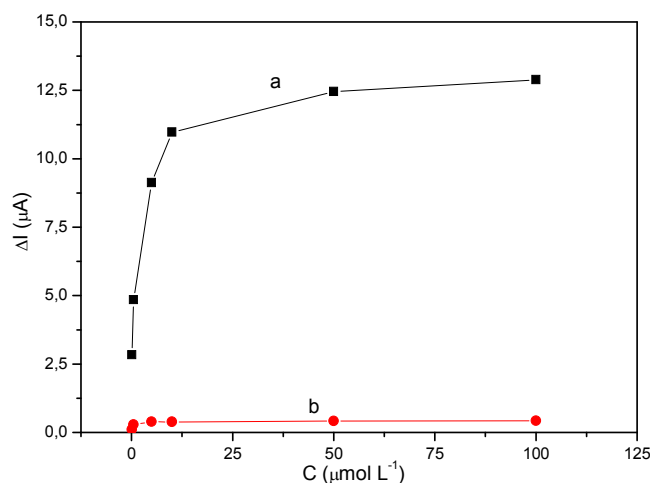
Figura 22: Voltamogramas de pulso diferencial do sensor GCE/RGO/AuNP/MIP com a variação da concentração de álcool isoamílico. Amplitude de modulação 50 mV, largura do pulso 50 ms e salto de potencial 4 mV.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com os dados obtidos da Figura 22, foi possível construir a curva do ΔI_p em função da concentração de álcool isoamílico, que varia de $1,0 \times 10^{-7}$ até $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} (Figura 23). O ΔI_p foi medido usando a relação: $\Delta I_p = I_c - I_0$, onde I_c é a corrente para a concentração c e I_0 é a corrente onde a concentração de álcool é igual a 0.

Figura 23: Dependência corrente de pico versus a variação da concentração de álcool isoamílico para o MIP (curva a) e NIP (curva b).

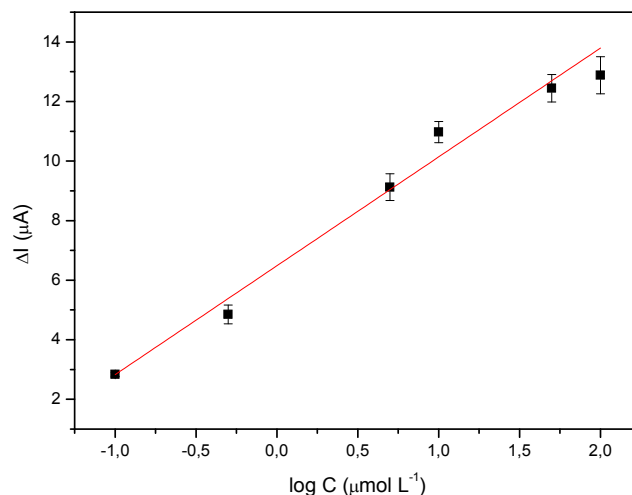


Fonte: Elaborado pelo autor.

Como pode ser observado, a diferença de corrente entre a curva (a) e a curva (b) é consideravelmente grande. A curva (b) é referente ao NIP, que é o polímero não impresso, ou seja, não há a adição do álcool isoamílico antes da eletropolimerização. Seu comportamento é diferente, pois como dito anteriormente, não há a adição do analito, logo não há formação das cavidades, impedindo a difusão da espécie eletroativa ($K_4[Fe(CN)_6]$) até a superfície do eletrodo, consequentemente diminuindo a corrente observada.

Com base nos dados obtidos, foi feita a curva analítica para o sensor GCE/RGO/AuNP/MIP desenvolvido, ilustrado na Figura 24.

Figura 24: Curva analítica para o sensor GCE/RGO/AuNP/MIP da ΔI_p em função do logaritmo da concentração de álcool isoamílico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a Figura 18, a ΔI_p é linear com o logaritmo da concentração de álcool isoamílico, ao longo do intervalo desde $1,0 \times 10^{-7}$ até $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A equação de regressão linear para o álcool isoamílico foi $\Delta I_p = 6,48 \times 10^{-6} + 3,66 \times 10^{-6} \log C$ e o coeficiente de regressão linear (R^2) encontrado foi 0,990.

O limite de detecção foi calculado nos termos de $3SD/s$, onde o SD é o desvio padrão e o s é a sensibilidade (inclinação) da curva de calibração. Com base nos dados obtidos no experimento, o limite de detecção encontrado foi de $8,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ ($S/N=6$).

4.10 Determinação do álcool isoamílico em amostra de óleo fúsel.

Para a determinação do álcool isoamílico em amostra real de óleo fúsel, foi utilizado o método de adição de padrão, que consiste em adicionar quantidades conhecidas do analito de interesse e quantidades conhecidas da amostra(65), uma vez que o óleo fúsel é uma matriz complexa.

A equação de regressão linear obtida da curva de adição de padrão para o álcool isoamílico foi $\Delta I_p = 7,59 \times 10^{-6} + 4,22 \times 10^{-6} \log C$ e com $R^2 = 0,980$. A amostra foi diluída 10.000 vezes e a concentração encontrada de álcool isoamílico na amostra de

óleo fúsel diluído foi de $1,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e na amostra $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram realizadas em triplicata.

Com esse mesmo estudo, foi possível realizar a validação do método proposto através do estudo de recuperação, que é um dos métodos mais utilizados para a validação de métodos analíticos e consiste na quantificação de determinado analito recuperado no processo em relação à quantidade presente na amostra real. A exatidão é expressa pelo erro inerente ao processo e os valores aceitos para recuperação são de 70 a 120%(66).

Foram adicionadas 3 concentrações diferentes de álcool isoamílico à amostra de óleo fúsel e os valores obtidos da recuperação são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Estudo de recuperação do álcool isoamílico em amostra de óleo fúsel.

Concentração adicionada / mol L⁻¹	Concentração encontrada / mol L⁻¹	Recuperação %
$5,0 \times 10^{-7}$	$4,84 \times 10^{-7}$	96,8
$5,0 \times 10^{-6}$	$4,98 \times 10^{-6}$	99,6
$5,0 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^{-5}$	100

Fonte: Elaborado pelo autor.

A recuperação média para o álcool isoamílico foi de 98,9% e o coeficiente de variação (CV) foi de 1,76%.

Estes valores não estão corretos, uma vez que o valor encontrado para o álcool isoamílico é menor que o limite de detecção e assim, os valores de recuperação da mesma forma não estão corretos. A repetição dos experimentos não foi possível. Visando o cumprimento do prazo estipulado para a elaboração desta dissertação, a repetição dos experimentos de determinação e recuperação, bem como o estudo de seletividade serão realizados como trabalhos futuros, com a publicação de um artigo científico.

5 CONCLUSÕES:

O sensor GCE/RGO/AuNP/MIP foi desenvolvido com como esperado, mostrando se funcional e a contribuição do óxido de grafeno reduzido e das nanopartículas de ouro foram satisfatórias. A determinação do álcool isoamílico foi realizada de forma indireta, uma vez que o álcool isoamílico não é eletroquimicamente ativo frente ao grafeno e as nanopartículas de ouro, sendo utilizada uma sonda eletroquímica, o ferricianeto de potássio. As concentrações de pirrol e álcool isoamílico, o tempo de remoção e de incubação do “template” foram otimizados a fim de se obter uma melhor performance do sensor.

Os estudos de velocidade de varredura foram realizados e os resultados obtidos mostram que o processo eletródico é controlado por difusão e que o sistema é reversível. Com o mesmo estudo foi possível determinar a área do eletrodo modificado, que foi de 13,4 mm².

De acordo com as imagens de MEV, espectros de EDX e a espectroscopia de impedância eletroquímica, pode se concluir que as modificações foram realizadas com sucesso.

Os estudos da performance analítica do sensor GCE/RGO/AuNP/MIP foram realizados, e foi encontrado um limite de detecção de $8,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ em um intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ até $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

O método de determinação proposto foi validado. Entretanto, os valores de recuperação e da determinação do álcool isoamílico em óleo fúsel não estão corretos, pois o tempo limite para a elaboração desta dissertação estava chegando em seu limite e visando o cumprimento do prazo estipulado, não houve tempo hábil para a repetição dos experimentos. Estes experimentos serão realizados como trabalhos futuros, com a publicação de um artigo científico.

REFERÊNCIAS

- 1 LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. O etanol combustível no Brasil. In: BRASIL. Ministério das Relações Exteriores. (Org.). **Biocombustíveis no Brasil**: realidades e perspectivas. Brasília, DF, 2007. p. 61-75.
- 2 PATIL, A. G.; KOOLWAL, S. M.; BUTALA H. D. Fusel oil: composition, removal and potential utilization. **International Sugar Journal**, v. 104, n. 1238, p. 51-58, 2002.
- 3 GARCIA, V. **Subproduto de destilaria de óleo fúsel**: caracterização da composição química e estudo de sua aplicação industrial. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Engenharia de Mauá, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2008.
- 4 KÜÇÜK, Z.; CEYLAN, K. Potential utilization of fusel oil: a kinetic approach for production of fusel oil esters through chemical reaction. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 289-300, 1998.
- 5 FERREIRA, M. C.; MEIRELLES, A. J. A.; BATISTA, E. A. C. Study of the fusel oil distillation process. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 6, p. 2336-2351, 2013.
- 6 CHAVES, A. R. C. et al. Óleo fúsel : caracterização e aplicações. In: ENCONTRO DE TECNOLOGIA DA UNIUBE, 7., 2011, Uberaba. **Resumos...** [S.l.:s.n], 2008. Disponível em: <<http://www.uniube.br/eventos/entec/2011/arquivos/quimica4.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2015.
- 7 PÉREZ, E. R.; CARDOSO, D. R.; FRANCO D. W. Análise dos álcoois, ésteres e compostos carbonílicos em amostras de óleo fúsel. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 10-12, 2001.
- 8 NEALE, M. Rapid high-performance liquid chromatography method for determination of ethanol and fusel oil in the alcoholic beverage industry. **Journal of Chromatography A**, v. 447, p. 443-450, 1988.
- 9 LaCOURSE, W. R. et al. Pulsed amperometric detection of aliphatic alcohols in liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 134-139, 1991
- 10 STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Review electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159-173, 2003.
- 11 JANATA, J.; BEZEGH, A. Chemical sensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 62R-74R, 1988.
- 12 BUDNIKOV, G. K. et al. Chemically modified electrodes with amperometric response in enantioselective analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 2-12, 2008.

- 13 XUE, C. et al. Electrochemical serotonin sensing interface based on double-layered membrane of reduced graphene oxide/polyaniline nanocomposites and molecularly imprinted polymers embedded with gold nanoparticles. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 196, p. 57-63, 2014.
- 14 TOGHILL, K. et al. The determination of methanol using an electrolytically fabricated nickel microparticle modified boron doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 5, p. 491-500, 2010.
- 15 URETA-ZAÑARTU, M. Electrocatalytic oxidation of alcohols at gold electrodes in alkaline media. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 8905-8928, 2012.
- 16 DAMJANOVIC, A.; BRUSIC, V. Electrode kinetics of oxygen reduction on oxide-free platinum electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 12, p. 615-628, Aug. 1967.
- 17 KUTNER, W. et al. Analytical aspects of chemically modified electrodes: classification, critical evaluation and recommendations. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 6, p. 1301-1318, 1998.
- 18 CASELLA, I. G.; GUASCITO, M. R. Electrocatalysis of ascorbic acid on the glassy carbon electrode chemically modified with polyaniline films. **Electroanalysis**, v. 9, n. 18, p. 1381-1386, 1997.
- 19 SONG, F. Y.; SHIU, K. K. Preconcentration and electroanalysis of silver species at polypyrrole film modified glassy carbon electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 498, n. 1/2, p. 161-170, 2001.
- 20 KAMIN, R. A.; WILSON, G. S. Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 1198-1205, 1980.
- 21 IANNIELLO, R. M.; YACYNICH, A. M. Immobilized enzyme chemically modified electrode as an amperometric sensor. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 2090-2095, 1981.
- 22 TEIXEIRA, M. F. S.; DOCKAL, E. R.; CAVALHEIRO, E. T. G. Sensor for cysteine based on oxovanadium(IV) complex of Salen modified carbon paste electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 106, n. 2, p. 619-625, 2005.
- 23 MARTIN, C. S.; TEIXEIRA, M. F. S. A novel Mn-containing conducting metallopolymer obtained by electropolymerization in aqueous solution of a tetranuclear oxo-bridged manganese complex. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 27, p. 7133-7136, 2011.
- 24 SHAO, Y. et al. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. **Electroanalysis**, v. 22, n. 10, p. 1027-1036, 2010.

- 25 LI, M. et al. Electrodeposition of nickel oxide and platinum nanoparticles on electrochemically reduced graphene oxide film as a nonenzymatic glucose sensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 192, p. 261-268, 2014.
- 26 YOLA, M. L.; ATAR, N. A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in p-aminothiophenol functionalized multi-walled carbon nanotubes: application to the simultaneous determination of quercetin and rutin. **Electrochimica Acta**, v. 119, p. 24-31, 2014.
- 27 SANTOS, L. C. D. et al. Anodic and cathodic pre-treatment effects on BDD surface to deposit copper nanoparticles applied to nitrate reduction. **MRS Proceedings**, v. 1395, 2012. doi:10.1557/opl.2012.79.
- 28 PRASAD, B. B. et al. Multiwalled carbon nanotubes bearing “terminal monomeric unit” for the fabrication of epinephrine imprinted polymer-based electrochemical sensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 45, p. 114-122, 2013.
- 29 SÁ, A. C. de; Paim, L. L.; STRADIOTTO, N. R. Sugars electrooxidation at glassy carbon electrode decorate with multi-walled carbon nanotubes with nickel oxy-hydroxide. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, p. 7746-7762, 2014.
- 30 WANG, Q. et al. An electrochemical sensor for reducing sugars based on a glassy carbon electrode modified with electropolymerized molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine film. **Electroanalysis**, v. 26, n. 7, p. 1612-1622, 2014.
- 31 NOVOSELOV, K. S. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666-669, 2004.
- 32 HUMMERS, W. S. Jr.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of American Chemical Society**, v. 80, n. 1937, p. 1339, 1958.
- 33 FURUKAWA, K.; UENO, Y. Biosensing on a graphene oxide surface. **NTT Technical Review**, v. 11, n. 8, 2013. Disponível em: <https://www.ntt-review.jp/archive/ntttechnical.php?contents=ntr201308fa7.pdf&mode=show_pdf>. Acesso em: 14 mar. 2016.
- 34 PUMERA, M. Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4146-4157, 2010.
- 35 TOH, S. Y. et al. Graphene production via electrochemical reduction of graphene oxide: synthesis and characterisation. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 422-434, 2014.
- 36 SHIN, H. J. et al. Efficient reduction of graphite oxide by sodium borohydride and its effect on electrical conductance. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 12, p. 1987-1992, 2009.

- 37 KIM, M. C.; HWANG, G. S.; RUOFF, R. S. Epoxide reduction with hydrazine on graphene: a first principles study. **The Journal of Chemical Physics**, v. 131, n. 6, p. 064704/1-064704/5, 2009.
- 38 DU, H. et al. A voltammetric sensor based on graphene-modified electrode for simultaneous determination of catechol and hydroquinone. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, v. 650, n. 2, p. 209-213, 2011.
- 39 CHEN, L. et al. Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode and its electrochemical application. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 2, p. 133-137, 2011.
- 40 ADHIKARI, B.-R.; GOVINDHAN, M.; CHEN, A. Sensitive detection of acetaminophen with graphene-based electrochemical sensor. **Electrochimica Acta**, v. 162, p. 198-204, 2015.
- 41 KIM, Y.-R. et al. Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using graphene modified electrodes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2366-2369, 2010.
- 42 CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 241-259, 2010.
- 43 ZHANG, Y. et al. Gold nanoparticles-carbon nanotubes modified sensor for electrochemical determination of organophosphate pesticides. **Microchimica Acta**, v. 165, n. 3/4, p. 307-311, 2009.
- 44 CONDE, J.; DORIA, G.; BAPTISTA, P. Noble metal nanoparticles applications in cancer. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/751075.
- 45 HEZARD, T. et al. Influence of the gold nanoparticles electrodeposition method on Hg(II) trace electrochemical detection. **Electrochimica Acta**, v. 73, p. 15-22, 2012.
- 46 SHARMA, P. S. et al. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3177-3204, 2012.
- 47 HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 7, p. 2495-2504, 2000.
- 48 LIAN, W. et al. Electrochemical sensor based on gold nanoparticles fabricated molecularly imprinted polymer film at chitosan-platinum nanoparticles/graphene-gold nanoparticles double nanocomposites modified electrode for detection of erythromycin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 38, n. 1, p. 163-169, 2012.
- 49 SUN, S. et al. A molecularly imprinted polymer with incorporated graphene oxide for electrochemical determination of quercetin. **Sensors**, v. 13, n. 5, p. 5493-5506, 2013.

- 50 TAN, X. et al. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer reduced graphene oxide and gold nanoparticles modified electrode for detection of carbofuran. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 216-221, 2015.
- 51 LI, X. et al. Electrochemical sensor based on magnetic graphene oxide@gold nanoparticles-molecular imprinted polymers for determination of dibutyl phthalate. **Talanta**, v. 131, p. 354-360, 2015.
- 52 CHEN, P.-Y. et al. A novel molecularly imprinted polymer thin film as biosensor for uric acid. **Talanta**, v. 80, n. 3, p. 1145-1151, 2010.
- 53 LIU, G. T. et al. One-step electrodeposition of graphene loaded nickel oxides nanoparticles for acetaminophen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 56, p. 26-32, 2014.
- 54 WANG, F.; ZHU, L.; ZHANG, J. Electrochemical sensor for levofloxacin based on molecularly imprinted polypyrrole-graphene-gold nanoparticles modified electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 192, p. 642-647, 2014.
- 55 PEI, Q.; QIAN, R. Electrochemical polymerization of pyrrole in aqueous buffer solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 322, n. 1/2, p. 153-166, 1992.
- 56 KWON, Y. et al. Electrocatalytic oxidation of alcohols on gold in alkaline media: base or gold catalysis? **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 18, p. 6914-6917, 2011.
- 57 BURKE, L. D.; CUNNANE, V. J.; LEE, B. H. Unusual postmonolayer oxide behavior of gold electrodes in base. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 139, n. 2, p. 399-406, 1992.
- 58 OCÓN, P. et al. Study of the electrooxidation of n-propanol on an Au electrode in basic medium. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 206, p. 179-196, 1986.
- 59 KAN, X. et al. Molecularly imprinted polymers based electrochemical sensor for bovine hemoglobin recognition. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 168, n. 2012, p. 395-401, 2012.
- 60 LI, B. L. et al. A novel strategy for selective determination of d-penicillamine based on molecularly imprinted polypyrrole electrode via the electrochemical oxidation with ferrocyanide. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 186, p. 96-102, 2013.
- 61 LIU, Y. T. et al. Electrochemical sensor based on a poly(para-aminobenzoic acid) film modified glassy carbon electrode for the determination of melamine in milk. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 12, p. 4595-4602, 2011.
- 62 GUPTA, V. K. et al. Molecular imprinted polypyrrole modified glassy carbon electrode for the determination of tobramycin. **Electrochimica Acta**, v. 112, p. 37-43, 2013.

63 MABBOTT, G. A. An introduction to cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 697-702, 1983.

64 ZENG, Y. et al. A novel composite of reduced graphene oxide and molecularly imprinted polymer for electrochemical sensing 4-nitrophenol. **Electrochimica Acta**, v. 130, p. 504-511, 2014.

65 RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

66 MESQUITA, N. B. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.