



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EDERSON DOS SANTOS MORETTI

**SÍNTESE DE POLI(ÁCIDO METACRÍLICO-HEMINA)
MOLECULARMENTE IMPRESSO SUPORTADO EM
NANOTUBOS DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO
VOLTAMÉTRICA SIMULTÂNEA DE ANTIOXIDANTES EM
MATRIZES LIPÍDICAS E BIODIESEL**

Londrina

2016

EDERSON DOS SANTOS MORETTI

**SÍNTESE DE POLI(ÁCIDO METACRÍLICO-HEMINA)
MOLECULARMENTE IMPRESSO SUPORTADO EM
NANOTUBOS DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO
VOLTAMÉTRICA SIMULTÂNEA DE ANTIOXIDANTES EM
MATRIZES LIPÍDICAS E BIODIESEL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química, com ênfase em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira
Tarley

Londrina
2016

EDERSON DOS SANTOS MORETTI

**SÍNTESE DE POLI(ÁCIDO METACRÍLICO-HEMINA)
MOLECULARMENTE IMPRESSO SUPORTADO EM
NANOTUBOS DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO
VOLTAMÉTRICA SIMULTÂNEA DE ANTIOXIDANTES EM
MATRIZES LIPÍDICAS E BIODIESEL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química, com ênfase em Química Analítica.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira
Tarley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Banca: Prof.(a) Dr.(a) Elen J. R. Sartori Braz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Banca: Prof. Dr. Cláudio Celestino de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 06 de junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus o grande criador que me propiciou condições para desenvolver este trabalho, uma pequena parte do entendimento sobre a natureza e as descobertas humanas.

Agradeço ao meu orientador César Ricardo Teixeira Tarley pela orientação científica durante este trabalho, pela sua forma de transmitir todo o conhecimento e experiência, que me desafiaram a buscar respostas para atingir os objetivos propostos, pelo apoio científico e pessoal, pelos conselhos, e, sobretudo por sua amizade e companheirismo.

À minha esposa Gislaine companheira em todos os momentos, ao meu filho Arthur que com sua inocência e amor torceu pelo meu sucesso e me vê “um cientista”, sendo eles a razão maior de todo meu esforço e dos sonhos futuros de minha vida.

Aos meus pais, Jecione e Sergio, ao meu irmão Mauricio, e a todos os meus familiares, que sempre me incentivaram a estudar, a quebrar paradigmas e buscar sempre superar obstáculos, descobrir e modificar o conhecimento da ciência para o bem dos seres vivos, e, sobretudo da pessoa humana. Em minha família descobri o verdadeiro significado da responsabilidade e do respeito à vida em seu sentido mais completo.

Aos sogros Alcides e Santina, ao meu cunhado Danilo e familiares que estiveram ao meu lado nesta caminhada, dando apoio incondicional ao meu trabalho.

Aos meus amigos Fernanda, Guilherme, Juliana, Eduardo, Felipe, Fabio, Lucinéia, Daniel, Leandro, Maiyara, Michele e Laís pelo companheirismo e amizade construída no decorrer do curso, muitas vezes foram o apoio necessário quando a preocupação, a dúvida e até mesmo a descoberta se fizeram presentes. Que a amizade verdadeira surgida entre o grupo, seja sempre cultivada e guardada em nossas lembranças.

Aos colegas de laboratório do grupo LADEMA (Laboratório de Desenvolvimento de Métodos Analíticos), por todo o auxílio e companheirismo neste período de trabalho.

A meus amigos pessoais Gracieli, Felipe e Viviane, pela amizade e compreensão durante esta etapa.

Não deixando de mencionar os meus alunos que direta ou indiretamente me impulsionaram a buscar conhecimentos e estratégias que contribuíssem com a construção do conhecimento científico. À Secretaria de Estado e Educação do Paraná (SEED), que me proporcionou condições para a realização deste mestrado.

E por fim a todos os meus amigos de São João do Ivaí, cidade em que me criei e ao Colégio Estadual Arthur de Azevedo no qual estudei e exerço minha profissão de professor, segunda razão deste Trabalho de Pós-Graduação.

Obrigado!

*“Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei
em ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

MORETTI, Ederson dos Santos. **Síntese de poli(ácido metacrílico-hemina) molecularmente impresso suportado em nanotubos de carbono para determinação voltamétrica simultânea de antioxidantes em matrizes lipídicas e biodiesel.** 2016. p. 105 Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

No presente trabalho é descrita a síntese de um novo nanocompósito baseado em poli(ácido metacrílico-hemina) molecularmente impresso com terc-butil-hidroquinona (TBHQ) ligado covalentemente em nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) (MIP-MWCNT) e seu uso no desenvolvimento de um sensor eletroquímico. As caracterizações química, física e morfológica foram realizadas por espectroscopia Raman, FT-IR, TGA, MEV, MET e análise textural. O sensor eletroquímico altamente seletivo para TBHQ foi preparado a partir da deposição da suspensão do nanocompósito sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo. Através de voltametria cíclica, foi observado que o sensor eletroquímico modificado com MIP-MWCNT apresentou elevado desempenho de reconhecimento molecular, maior resposta analítica e propriedades catalíticas em relação ao TBHQ quando comparado com NIP-MWCNT (nanocompósito polimerizado sem a adição de TBHQ), MIP-MWCNT sem hemina e MIP-hemina sem MWCNT. Tais resultados demonstraram o efeito sinérgico da influência de impressão, MWCNT e hemina na melhoria do desempenho do sensor eletroquímico. Por meio de medidas cronoamperométricas, o sensor eletroquímico modificado com MIP-MWCNT pode reconhecer TBHQ seletivamente na presença de compostos eletroativos e estruturalmente similares. Sob condições otimizadas de voltametria de pulso diferencial (amplitude de pulso de 100 mV, tempo de pulso de 25 ms e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹) e medidas realizadas em H₂SO₄ 0,15 mol L⁻¹, o método proposto permitiu a determinação simultânea de TBHQ e hidroxianisol butilado (BHA) com sucesso, obtendo-se limites de detecção de 0,85 e 0,50 μmol L⁻¹, respectivamente. A viabilidade do método foi verificada por determinação simultânea de TBHQ e BHA em óleo de soja, margarina, maionese e biodiesel, cujos resultados foram estatisticamente iguais àqueles obtidos através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Palavras-chave: TBHQ, nanocompósito, seletividade, Hemina, voltamétrico, MWCNT.

MORETTI, Ederson dos Santos. **Síntese de poli(ácido metacrílico-hemina) molecularmente impresso suportado em nanotubos de carbono para determinação voltamétrica simultânea de antioxidantes em matrizes lipídicas e biodiesel**. 2016. p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

This paper reports the synthesis of novel nanocomposite based on poly(methacrylic acid-hemin) molecularly imprinted with tert-butylhydroquinone (TBHQ) covalently bonded in multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) and its use in the construction of electrochemical sensor. Chemical, physical and morphological characterizations of nanocomposite were performed by Raman spectroscopy, FT-IR, TGA, SEM, TEM and textural analysis. The electrochemical sensor highly selective to TBHQ was prepared by drop-casting a suspension of nanocomposite on the surface of a glassy carbon electrode. From cyclic voltammetry, it was observed that the electrochemical sensor modified with MIP-MWCNT exhibited great molecular recognition performance, higher analytical response and catalytic properties towards the TBHQ when compared to NIP-MWCNT (nanocomposite polymerized without adding TBHQ), MIP-MWCNT without hemin and MIP-hemin without MWCNT. Such results demonstrated the synergic effect of imprinting influence, MWCNT and hemin in improving the performance of electrochemical sensor. From chronoamperometric measures, the electrochemical sensor modified with MIP-MWCNT could recognize TBHQ selectively in the presence of electroactives and structurally similar compounds. Under optimized conditions by pulse differential voltammetry (pulse amplitude of 100 mV, pulse time of 25 ms and scan rate of 10 mV s⁻¹) and measures in 0.15 mol L⁻¹ H₂SO₄, the proposed method successfully enabled the simultaneous determination of TBHQ and butylated hydroxyanisole (BHA), yielding limits of detection of 0.85 and 0.50 μmol L⁻¹, respectively. The feasibility of the method was checked by simultaneous determination of TBHQ and BHA in soybean oil, margarine, mayonnaise and biodiesel, whose results were statistically equal to those achieved by high performance liquid chromatography (HPLC).

Key words : TBHQ , nanocomposite , selectivity, Hemin , voltammetric , MWCNT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmulas estruturais de (A) TBHQ e (B) BHA.....	21
Figura 2 - Representação esquemática da formação do MIP.....	28
Figura 3 - Estrutura de alguns monômeros funcionais usados na síntese de MIPs .	29
Figura 4 - Fórmula estrutural de reagentes de ligação cruzada empregados na síntese de MIP	30
Figura 5 - Estrutura molecular do AIBN.....	30
Figura 6 - Representação de um gráfico de aplicação de potencial vs tempo em voltametria de pulso diferencial.....	33
Figura 7 - Representação de um gráfico de aplicação de potencial vs tempo em voltametria de onda quadrada.....	34
Figura 8 - Representação estrutural dos SWCNT e MWCNT.....	36
Figura 9 – Fórmula estrutural da (A) Protoporfinina e (B) Protoporfirina de ferro	37
Figura 10 - Representação esquemática da síntese de MIP de vinil-imidazol na superfície de MWCNT.	42
Figura 11 – Sistema utilizado para a oxidação dos MWCNT.....	46
Figura 12 – Sistema utilizado para a funcionalização dos MWCNT-OXI.....	47
Figura 13 – Sistema utilizado para a síntese do nanocompósito.....	48
Figura 14 - Representação esquemática das etapas da síntese do nanocompósito MIP-MWCNT.....	49
Figura 15 – Esquema representativo do preparo do sensor.....	50
Figura 16 - Espectros de infravermelho dos materiais obtidos na síntese. (A) MWCNT, MWCNT-OXI e MWCNT-VN, (B) MIP-MWCNT sem hemina, MIP-Hemina sem MWCNT, NIP-MWCNT e MIP-MWCNT.....	54
Figura 17 - Termogramas dos materiais obtidos em cada etapa de síntese. Curva TG.....	56
Figura 18 - Termogramas dos materiais obtidos em cada etapa de síntese. Curva DTG.....	56
Figura 19 - Espectro de Raman de (A) MWCNT, (B) MWCNT-OXI e (C)MWCNT-VN.	58
Figura 20 - Micrografias eletrônica de varredura, com aumento de 30000 vezes, do (A) MWCNT, (B) MWCNT-OXI, (C)MWCNT-VN, (D)MIP-MWCNT, (E) NIP-MWCNT, (F) MIP-MWCNT sem hemina e (G) MIP-Hemina sem MWCNT.....	59

Figura 21 - Micrografias eletrônica de transmissão do (A) MWCNT-VN, (B) MIP-MWCNT e (C) NIP-MWCNT.....	61
Figura 22 - Voltamogramas cíclicos obtidos para TBHQ na presença de H ₂ O ₂ e O ₂ (A), presença de H ₂ O ₂ e ausência O ₂ (B) e ausência de H ₂ O ₂ e O ₂ (C). Condições: Eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0), 30 mV s ⁻¹ , 2º ciclo.....	63
Figura 23 - Comparação do comportamento voltamétrico catódico de TBHQ (35 μmol L ⁻¹) e branco, com eletrodos de CV (A) e (B), CV-MWCNT (C) e (D), CV-MIP-MWCNT (E) e (F). Por voltametria cíclica. Condições: Eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0), 30 mV s ⁻¹ , 2º ciclo.....	65
Figura 24 - Voltamogramas cíclicos de TBHQ (100 μmol L ⁻¹) na ausência de oxigênio em eletrodos de CV, CV-MWCNT, CV-MIP-MWCNT.: Eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0), 30 mV s ⁻¹ , 2º ciclo.....	66
Figura 25 - Voltamogramas cíclicos de TBHQ (100 μmol L ⁻¹) na ausência de oxigênio em eletrodos de CV-MIP-MWCNT, CV-MWCNT, CV- NAFION [®] e CV-MWCNT sem NAFION [®] : Eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0), 30 mV s ⁻¹ , 2º ciclo.	67
Figura 26 - (A) Voltamogramas cíclicos de TBHQ (100 μmol L ⁻¹) em eletrodos de CV, CV-MIP-MWCNT, CV-MIP-Hemina sem MWCNT e CV-MIP-MWCNT sem hemina. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0), 30 mV s ⁻¹ , 2º ciclo e sem oxigênio e (B) Possíveis interações entre TBHQ e o MIP-MWCNT.	69
Figura 27 - Diagramas de Niquist de: (A) CV; (B) CV-MIP-MWCNT; (C) CV-NIP-MWCNT; (D) CV-MIP-MWCNT sem hemina e (E) CV-MIP-Hemina sem MWCNT...	71
Figura 28 - Otimização da concentração da suspensão. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0), 30 mV s ⁻¹ , 2º ciclo e sem oxigênio.	72
Figura 29 - (A) Estudo de pH na faixa de 4 à 9 com tampão BR 0,05 mol L ⁻¹ e pH 1,2 com ácido sulfúrico 0,05 mol L ⁻¹ ; (B) Dependência do pH com Epa (V).....	73
Figura 30 - (A) Voltamogramas de TBHQ (100 μmol L ⁻¹); (B) Relação entre log I vs log v. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0).....	74
Figura 31 - Estudo de tipo de eletrólito. Condições Analíticas: 100 μmol L ⁻¹ de TBHQ, voltametria cíclica, com o sensor CV-MIP-MWCNT, 30 mV s ⁻¹ e 2º ciclo.....	75
Figura 32 - Avaliação da concentração do eletrólito. Condições Analíticas: 100 μmol L ⁻¹ de TBHQ, voltametria cíclica, com o sensor CV-MIP-MWCNT, 30 mV s ⁻¹ e 2º ciclo.	76

Figura 33 - Voltamogramas cíclicos de TBHQ (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em eletrodos de CV, CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT: Eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0), 30 mV s^{-1} , 2º ciclo.....	77
Figura 34 - Medidas cronoamperométricas de TBHQ e outras substâncias (A) em pH 7,0: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0) e (B) em condições ótimas: eletrólito H_2SO_4 0,15 mol L^{-1}	78
Figura 35 - Gráfico de I_{pa} versus v para TBHQ (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), utilizando os sensores (A) CV-MIP-MWCNT e (B). CV-MIP-MWCNT. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0).....	79
Figura 36 - Gráfico de E_p vs $\log v$ para TBHQ (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), utilizando os sensores (A) CV-MIP-MWCNT e (B). CV-MIP-MWCNT. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0).....	80
Figura 37 - Voltamogramas cíclicos em eletrodos de CV e CV-MIP-MWCNT para (A) TBHQ, (B) BHA, (C) determinação simultânea de TBHQ e BHA: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0), 30 mV s^{-1} , 2º ciclo e (D) determinação simultânea de TBHQ e BHA nas condições ótimas: eletrólito H_2SO_4 0,15 mol L^{-1} , 30 mV s^{-1} , 2º ciclo.....	82
Figura 38 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial de TBHQ e BHA simultâneos; (B) Curvas analíticas de TBHQ; (C) Curva analítica de BHA. Condições Analíticas: eletrólito H_2SO_4 0,15 mol L^{-1} . AP= 100 mV, VV= 10 mV s^{-1} e TP= 25ms.	85
Figura 39 - Voltamogramas cíclicos de TBHQ (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes datas com o sensor CV-MIP-MWCNT. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0), 30 mV s^{-1} , 2º ciclo.....	86
Figura 40 - Cromatogramas das amostra de (A) Óleo de soja (1), (B) Maionese (1), (C) Margarina (1), (D) Biodiesel (2) e voltamogramas das amostras de (E) Óleo de soja (1), (F) Maionese (1), (G) Margarina (1) e (H) Biodiesel (2).....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Área de superfície, volume de poros e tamanhos de poros.....	61
Tabela 2- Área eletroativa dos eletrodos.	70
Tabela 3 - Faixa estudada valores otimizados, obtidos para a determinação simultânea de TBHQ e BHA para VPD e VOC.....	84
Tabela 4 - Comparação do método proposto com outros métodos eletroquímicos..	87
Tabela 5 - Ensaio de adição e recuperação de TBHQ e BHA em amostra de óleos e soja com o sensor CV-MIP-MWCNT.....	88
Tabela 6 - Determinação de TBHQ e BHA em matrizes lipídicas e biodiesel, usando o método proposto (CV-MIP-MWCNT) e HPLC.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AIBN	2,2'-azo-bis-iso-butironitrila
AP	Amplitude de pulso
BDDE	Eletrodo de diamante dopado com boro (do inglês, <i>Boron Doped Diamond Electrode</i>)
BHA	Butil-hidróxianisol
BHT	butil-hidroxitolueno
BR	Britton-Robinson
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amônio (do inglês <i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>)
CV	Carbono Vítreo
DMF	Dimeil-formamida
DPR	Desvio padrão relativo
DTG	Análise termogravimétrica derivada (do inglês derivative thermogravimetric analysis)
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Forier
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IP	Incremento de potencial
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAA	Ácido metacrílico
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão.
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP	Polímero Molecularmente Impresso (do inglês <i>Molecularly Imprinted Polymer</i>)
MWCNT	Nanotubos de carbono multi-parede (do inglês <i>Multi-walled Carbon Nanotubes</i>)
NIP	Polímero não Impresso (do inglês <i>Non Imprinted Polymer</i>)
NTC	Nanotubos de carbono
PG	Propil galato

SWCNT	Nanotubos de carbono de parede simples (do inglês <i>Single-walled Carbon Nanotubes</i>)
TBHQ	Tercbutil-hidroquinona
TG	Análise termogravimétrica (do inglês thermogravimetric analysis)
TP	Tempo de pulso
TRIM	Trimetilpropano trimetacrilato
UV-VIS	Ultravioleta visível
VOC	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
VTMS	Viniltrimetoxisilano
VV	Velocidade de varredura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 ANTIOXIDANTES EM MATRIZES LIPÍDICAS	20
2.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM MATRIZES LIPÍDICAS E BIODIESEL	24
2.2 POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE (MIP)	27
2.3 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	31
2.3.1 Voltametria Cíclica	31
2.3.2 Técnicas de pulso	32
2.3.3 Amperometria	35
2.4 NANOTUBOS DE CARBONO	35
2.5 PROTOPORFIRINAS	37
2.6 HEMINA, MWCNT E MIP, POTENCIALIDADES EM ELETROANALÍTICA	39
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 EQUIPAMENTOS	44
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	45
4.3 SÍNTESE DO POLÍMERO NA SUPERFÍCIE DOS MWCNT	46
4.4 PREPARO DOS ELETRODOS	49
4.4.1 Eletrodos de carbono vítreo modificados com MIP-MWCNT, NIP-MWCNT, MIP-Hemina sem MWCNT e MIP-MWCNT sem hemina	49
4.4.2 Eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de MWCNT (CV-MWCNT) ..	50
4.5 PROCEDIMENTO ELETROANALÍTICO	50
4.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	51
4.7 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA SUSPENSÃO	51
4.8 PREPARO DE AMOSTRAS	51

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	54
5.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN	58
5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	59
5.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM MIP-MWCNT COMO SENSOR BIOMIMÉTICO DE PEROXIDASE	62
5.5 COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DE TBHQ UTILIZANDO ELETRODOS DE CV, CV-MWCNT E CV- MIP-MWCNT NA AUSÊNCIA DE H ₂ O ₂	66
5.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUSPENSÃO E PH, NA OXIDAÇÃO DE TBHQ.	71
5.7 INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA NA ELETRO-OXIDAÇÃO DE TBHQ	74
5.8 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO E TIPO DE ELETRÓLITO NA OXIDAÇÃO DE TBHQ	75
5.9 ESTUDOS DE IMPRESSÃO QUÍMICA E SELETIVIDADE	76
5.10 CONCENTRAÇÃO SUPERFICIAL E PARÂMETROS CINÉTICOS.	78
5.11 AVALIAÇÃO DO SENSOR CV-MIP-MWCNT PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TBHQ E BHA	81
5.12 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA ELETROANALÍTICA.....	83
5.13 DESEMPENHO ANALÍTICO DO SENSOR CV-MIP-MWCNT PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TBHQ E BHA POR VPD.....	84
5.14 APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	88
6 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

Por apresentarem ácidos graxos em sua composição, matrizes lipídicas são suscetíveis a processos oxidativos desencadeados por fatores como temperatura, radiação, íons metálicos, umidade, entre outras condições detectadas em seu processo de obtenção e estocagem (JAIN; SHARMA, 2013). No setor alimentício, tais reações são indesejáveis, pois comprometem a qualidade de produtos industrializados (como óleo, margarinas e manteigas) causando perda de nutrientes e alterações visuais, olfativas e gustativas. Além disso, essas reações são responsáveis por diversas enfermidades, devido ao processo de oxidação produzir radicais livres (RAMALHO; JORGE, 2006).

A adição de antioxidantes, substâncias que inibem o processo oxidativo, para preservar compostos lipídicos dos produtos é a prática adotada em escala industrial. Para o consumo humano, são utilizados preferencialmente os antioxidantes sintéticos que podem ser adicionados em baixa concentração e que não alteram as propriedades do produto (SANTOS, 2014). Entre os antioxidantes mais utilizados para compostos de origem lipídica estão a TBHQ e o BHA, compostos fenólicos sintéticos da classe dos antioxidantes primários, que tem como mecanismo de ação a doação de hidrogênio ou par eletrônico para os radicais livres, tornando-os estáveis e evitando assim sua propagação na amostra lipídica (RAMALHO; JORGE, 2006; BORSATO et al., 2012).

Recentemente, a adição de antioxidantes sintéticos em produtos alimentícios tem sido questionada, pois estudos apontam que em concentrações elevadas, estas substâncias podem apresentar fenômenos de apoptose e atividade carcinogênica (KASHANIAN; DOLATABADI, 2009; ESKANDANI; HAMISHEHKAR; DOLATABADI, 2014; MA et al., 2013; DOLATABADI; KASHANIAN, 2010). No Brasil, a ANVISA (2014) limita o uso de TBHQ e BHA nos alimentos a base de óleo e gorduras em $200 \mu\text{g g}^{-1}$ e, para garantir que esses limites sejam respeitados torna-se necessário o seu monitoramento nos processos industriais.

O uso de antioxidantes em biodiesel também é essencial para prevenir a sua degradação durante o armazenamento, pois isto pode acarretar em danos aos motores dos veículos (BORSATO et al., 2012). Além disso, relata-se na literatura que o uso de antioxidantes em biodiesel, principalmente o TBHQ, pode diminuir as emissões de NO_x , para a atmosfera, uma vez que estas emissões são

uma das poucas desvantagens do biocombustível em relação ao Diesel comum (HESS et al., 2005).

Como mais de um antioxidante é utilizado em matrizes alimentícias lipídicas, métodos analíticos com seletividade pronunciada são necessários para promover a determinação destas substâncias.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (LI et al, 2014) e cromatografia a gás (GC) (DING; ZOU, 2012; YANG et al, 2002) são técnicas utilizadas para determinação de antioxidantes em amostras lipídicas. No entanto, trabalhos relacionados ao uso de técnicas eletroanalíticas vêm ganhando destaque (ARAÚJO et al., 2010; ARAÚJO et al., 2011; CARAMIT et al., 2013; GOULART et al., 2014; LIN; NI; KOKOT, 2013; RAYMUNDO et al., 2007; TORMIN et al., 2010; TORMIN et al., 2012) devido ao menor tempo de análise, baixo custo operacional e, por gerar menos resíduos nocivos ao meio ambiente. Porém, eletrodos à base de carbono não modificados podem apresentar desempenho ineficiente para determinação simultânea dos compostos fenólicos supracitados (NI; WANG; KOKOT, 2000).

Algumas estratégias têm sido reportadas na literatura para determinação de antioxidantes em alimentos empregando sensores eletroquímicos modificados. Cita-se, por exemplo, o trabalho de Yue e colaboradores (2015) que modificaram a superfície do eletrodo de carbono vítreo com filme de nanocompósito binário de óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente e nanopartículas de ouro (AuNPs / ERGO) para determinação simultânea de BHA e TBHQ por voltametria de varredura linear. No trabalho de Caramit et al. (2015), um eletrodo impresso contendo MWCNT foi utilizado para a determinação simultânea de TBHQ, propilgalato (PG) e BHA por voltametria de varredura linear. Neste trabalho, fez-se necessário empregar surfactante catiônico para a separação dos compostos e o uso do processo de deconvolução dos picos de oxidação para alcançar resultados satisfatórios na determinação simultânea dos três antioxidantes.

Como mencionado, estratégias de modificação de eletrodo base são necessárias para viabilizar a análise de amostras complexas lipídicas para determinação de antioxidantes. Neste sentido, o emprego de polímeros molecularmente impressos (do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*, MIP) na confecção de sensores surge como um processo promissor, uma vez que tais polímeros apresentam seletividade adequada aliada a estabilidade química, fácil

manipulação e baixo custo de obtenção (TARLEY et al., 2005b). Porém, cabe salientar que os MIP, em sua grande maioria, são materiais isolantes e, portanto, seu emprego para modificação direta de eletrodos base pode acarretar bloqueio de transferência de elétrons. Neste caso, faz-se necessário utilizar materiais carbonáceos condutores, tais como grafite, grafeno e nanotubos de carbono, visando à formação de compósitos, usualmente na forma pastas de carbono (ALIZADEH et al., 2010; TARLEY et al., 2005b; SADEGHI; MOTAHARIAN, 2013). Apesar de bastante empregada, esta estratégia pode diminuir o caráter seletivo dos polímeros, pois a pasta pode não ser homogênea e, a quantidade de material carbonáceo empregada em relação do MIP é geralmente superior. Desta forma, a síntese de polímeros na superfície dos MWCNT pode ser uma estratégia atraente por formar compósitos mais homogêneos como o relatado por Yang et. al. (2005), que funcionalizaram MWCNT com o agente de acoplamento KH570 (propilmetacrilato-trimethoxisilano) visando disponibilizar grupos vinílicos para a síntese de um polímero de vinil-imidazol em sua superfície. Segundo os autores, além de melhorar a dispersão do compósito em solventes orgânicos, este tipo de síntese abre novas perspectivas para o desenvolvimento de materiais funcionais com novas propriedades ópticas, magnéticas, elétricas e mecânicas.

É importante mencionar que apenas uma estratégia com foco no desenvolvimento de sensor eletroquímico modificado com MIP visando à determinação do antioxidante TBHQ, é reportada no trabalho de Zhao e Hao (2013), que sintetizaram nanopartículas de sílica recobertas com polímero molecularmente impresso para TBHQ. As nanopartículas foram dispersas em solução de quitosana 0,1% (m/m), depositadas na superfície do eletrodo de carbono vítreo e secas. O sensor apresentou seletividade satisfatória para a TBHQ, porém as medidas eletroquímicas foram obtidas após um tempo de pré-concentração de 30 minutos, o que diminui a frequência analítica do método proposto.

Tem-se relatado na literatura que, de maneira geral, a seletividade ao dispositivo eletroanalítico frente a compostos fenólicos pode ser melhorada quando o MIP é sintetizado na presença de hemina, uma protoporfirina de ferro. A hemina mimetiza o grupo prostético da enzima peroxidase e, portanto, na presença de peróxido de hidrogênio, o composto fenólico pode atuar como mediador de elétrons (SARTORI et al., 2011; NETO et al., 2001). No trabalho de Neto e colaboradores (2011) um MIP foi sintetizado utilizando o ácido metacrílico como

monômero e a hemina como centro catalítico. O MIP foi imobilizado na superfície de um eletrodo de carbono vítreo para a construção de um sensor biomimético aplicado na determinação amperométrica de 4 – aminofenol em águas de rio. Segundo os autores, o sensor atuou mimetizando o mecanismo da enzima peroxidase, e apresentou repetibilidade e seletividade satisfatórias.

O potencial de interação da hemina com compostos fenólicos também poder ser explorado na confecção de sensores eletroquímicos baseados em nanocompósitos preparados pela mistura da hemina com materiais carbonáceos (ZOU et al., 2015; ZHANG et al., 2013). No trabalho de Zhang e colaboradores (2013), foi sintetizado um complexo de hemina, óxido de grafeno e nanotubos de carbono, empregando-o no preparo de um sensor para determinação de H_2O_2 e determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina, ácido úrico e triptofano em amostras de soro e urina. Os autores relataram efeitos sinérgicos entre a hemina e os materiais carbonáceos na determinação dos compostos fenólicos.

Mediante o exposto, observa-se que a associação dos MIP sintetizados na presença de hemina e suportados em MWCNT pode ser uma estratégia promissora na síntese de novos materiais para construção de sensores biomiméticos com sensibilidade e seletividade adequadas. Assim sendo, este trabalho propõe a síntese e caracterização de um nanocompósito (MIP-MWCNT) baseado em poli(ácido metacrílico-hemina) molecularmente impresso suportados em MWCNT, bem como o emprego do nanocompósito para confecção de um sensor biomimético visando a determinação de TBHQ em amostras lipídicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Considerando a ideia geral desta dissertação de Mestrado e para seu melhor entendimento, a revisão bibliográfica versará, inicialmente, sobre propriedades de antioxidantes em matrizes lipídicas e suas implicações na saúde humana. Posteriormente, serão apresentados alguns métodos analíticos dedicados à determinação de antioxidantes em matrizes lipídicas e biodiesel enfatizando as diferentes alternativas. Considerando que os MIP constituem como o tema central da dissertação, serão apresentados, sucintamente, o estado da arte da síntese destes materiais. Posteriormente, uma explanação geral sobre técnicas eletroquímicas utilizadas na dissertação será apresentada e, na sequência, as potencialidades analíticas de nanotubos de carbono e hemina, componentes utilizados na síntese do nanocompósito serão apresentadas. Por fim, alguns trabalhos sobre o emprego de MIP, Hemina e nanotubos de carbono serão apresentados, enfatizando que o preparo de nanocompósito, por meio da associação destes três componentes, e seu uso no desenvolvimento de sensores eletroquímicos quimicamente modificados se figura como uma estratégia promissora.

2.1 ANTIOXIDANTES EM MATRIZES LIPÍDICAS.

Os produtos de origem lipídica, principalmente os que apresentam ácidos graxos insaturados em sua composição são propensos a processos de oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006). Esses tipos de reações podem alterar as características de produtos alimentícios como óleos, margarinas, maioneses entre outros, causando-lhes mudanças no odor, sabor e nutrientes, podendo também ocorrer à formação de compostos potencialmente tóxicos, o que pode diminuir seu tempo de conservação, e inviabilizar seu consumo (SANTOS, 2014). A oxidação lipídica também pode ocorrer em biocombustíveis como o biodiesel, o que acarreta no aumento da acidez do produto e formação de depósitos insolúveis que comprometem o funcionamento dos motores dos veículos (BORSATO et al., 2012; MCCORMICK; WESTBROOK, 2010).

Com o intuito de impedir ou retardar a oxidação desses produtos, são adotados vários procedimentos preventivos desde no seu processamento na indústria, passando pelas fases de armazenamento e transporte até sua utilização

pelo consumidor. Para tanto, se evita o contato dos produtos de origem lipídica com a luz e contaminantes, tais como íons metálicos, oxigênio e umidade. Na indústria utiliza-se a adição de antioxidantes para conter os processos oxidativos (BARLEY, 2005). Os antioxidantes podem ser naturais ou sintéticos, sendo que os antioxidantes naturais são uma ótima alternativa para controlar a oxidação dos compostos lipídicos podendo até melhorar o valor nutricional dos alimentos (SANTOS, 2014), porém eles podem apresentar baixa estabilidade, em virtude disso muitos fabricantes de alimentos optam pelo uso dos antioxidantes fenólicos sintéticos (LIN; NI; KOKOT, 2013).

Os antioxidantes sintéticos são compostos fenólicos da classe dos antioxidantes primários, que atuam doando prótons para os radicais livres formados tornando-os estáveis, inibindo assim a reação em cadeia presente no processo de auto-oxidação dos compostos lipídicos. Dentre os antioxidantes mais utilizados em processos industriais pode-se citar o BHA e o TBHQ (RAMALHO; JORGE, 2006), que apresentam a fórmula estrutural representada na Figura 1.

Figura 1 - Fórmulas estruturais de (A) TBHQ e (B) BHA



O BHA é composto por uma mistura de dois isômeros, o 3-t-butil-4-hidroxianisol (3-BHA), que possui uma maior atividade antioxidante, e o 2-t-butil-hidroxianisol (2-BHA), numa proporção aproximada de 90 % e 10% respectivamente (BARLEY, 2005). Este composto fenólico apresenta-se na forma de um sólido de cor branca (ponto de fusão (PF) 58-60 °C), insolúvel em água, solúvel em etanol (5 g 100 mL⁻¹). Com fórmula molecular C₁₁H₁₆O₂ e massa molar 180,24 g mol⁻¹ (SIGMA-ALDRICH, 2016a), o BHA é um antioxidante que apresenta maior eficiência em gorduras animais do que em óleos vegetais. Possui baixa estabilidade em temperaturas mais elevadas, podendo atribuir odor aos alimentos quando utilizado por muito tempo em processos de fritura.

O TBHQ é um composto fenólico que possui duas hidroxilas ligadas nas posições 1 e 4 de um anel benzeno, além de um grupo terc-butil na posição 2. Em temperatura ambiente pó de cor castanho-claro, que possui fórmula molecular $C_{10}H_{14}O_2$, massa molar $166,22 \text{ g mol}^{-1}$ e PF de $127-129 \text{ }^\circ \text{C}$ (SIGMA-ALDRICH, 2016b). É um composto fenólico com propriedades antioxidantes, moderadamente solúvel em óleos e gorduras, muito utilizado industrialmente na conservação de compostos de origem lipídica, devido à sua eficácia, com ação equivalente ou maior em relação aos outros antioxidantes encontrados no mercado, conferindo ótima estabilidade aos produtos finais (BORSATO et al., 2012; RAMALHO; JORGE, 2006).

Estudos têm relacionado o uso de antioxidantes a modificações na estrutura do DNA, e outras interações nos organismos. Em 1996 Nagai et. al., constataram a formação de 8-hidroxi-desoxiguanosina no timo de bezerros, tal composto é gerado na reação do TBHQ com a estrutura do DNA. Em outro trabalho Kashanian & Dolatabadi (2009), a partir de experimentos espectroscopia de UV e fluorescência, voltametria e análises de viscosidade, confirmaram o relatado por Nagai et. al, comprovando a afinidade do TBHQ com o DNA, e os possíveis danos causados pelo antioxidante. Os autores ainda sugerem a proibição do uso do antioxidante como aditivos em alimentos, uma vez que a concentração nos experimentos foi de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ou seja, bem menor que a dosagem utilizada na indústria.

Em estudos mais recentes, Eskandani et al. (2014), trataram células cancerígenas do pulmão e células umbilicais humanas com TBHQ, para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do antioxidante, observando que na presença do antioxidante houve a diminuição do crescimento das células cancerosas, porém o composto fenólico induziu a apoptose nas células normais em razão da fragmentação da cromatina do DNA. Os autores também mencionam que o composto estimula a carcinogenicidade, mostrando o risco do uso deste antioxidante como aditivo em alimentos.

Altmann et al. (1985), investigaram a ocorrência de lesões (hiperplasia) no estômago de ratos induzidas pelo consumo de BHA, assim como o já relatado em trabalho anterior (ITO et al. 1983). Nesta pesquisa, constatou-se que as lesões regrediram após interromper o uso do antioxidante, porém os autores sugerem que as lesões podem evoluir para tumores. Nos estudos realizados por Lauriault, Grasso e Powell (1990), verificou-se que as dosagens de BHA

empregadas nos trabalhos anteriores (0,5 a 2%) eram muito acima das utilizadas nos processos industriais, o que tornaria improvável a ocorrência de tais lesões em humanos.

Os estudos que relacionam o consumo de BHA e a ocorrência de câncer em humanos são escassos. BOTTERWECK et al. (2000) acompanharam os efeitos da ingestão de BHA e BHT em um grupo de 2035 pessoas formado por homens e mulheres na faixa etária de 55 a 69 anos por 6,3 anos. Neste período verificou-se a incidência de 192 casos de câncer de estômago, porém não foi constatada relação significativa entre os casos de câncer e o consumo dos antioxidantes, em dosagens baixas.

Em virtude dos possíveis riscos a saúde, a dosagem máxima de TBHQ e BHA em alimentos tem sido limitada a $200 \mu\text{g g}^{-1}$ pelas agências reguladoras de alguns países como o Brasil, China, Estados Unidos da América e da União Europeia, para a maioria dos alimentos. Contudo, no Japão estes compostos foram proibidos, o que mostra a grande importância do controle de qualidade na produção industrial de óleos e gorduras (ANVISA, 2014; CODEX, 2015; EFSA, 2011; OLIVEIRA et al., 2014; RAMALHO; JORGE, 2006).

O controle de qualidade na produção de biodiesel, no que diz respeito ao uso de antioxidantes, também é de suma importância, uma vez que além de prevenir os problemas decorrentes dos processos de oxidação supracitados, o uso destes compostos pode diminuir de forma significativa as emissões de NO_x , para o meio ambiente. Vale salientar que as emissões de NO_x figuram como um dos principais fatores negativos do biodiesel em comparação com os combustíveis fósseis (diesel comum) (HESS et al., 2005).

Mediante o exposto fica clara a necessidade de monitoramento de antioxidantes adicionados em matrizes lipídicas e biodiesel e, sobretudo, o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes para determinação destes compostos.

2.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM MATRIZES LIPÍDICAS E BIODIESEL

Relata-se na literatura o uso de técnicas cromatográficas (líquida ou gasosa) para a determinação antioxidantes em compostos lipídicos (CACHO et al., 2012; DING; ZOU, 2012; LI et al., 2014; SAAD et al. 2007). Ding & Zou (2012), utilizaram cromatografia a gás acoplada com espectrometria de massas para a determinação de BHT, BHA e TBHQ, simultaneamente em amostras de óleo comestível. Para o preparo da amostra foi utilizada a microextração líquido-líquido, na qual 50mg da amostra foram misturados com 0,5 mL de acetonitrila. A mistura foi levada ao banho de ultrassom e depois centrifugada, o procedimento foi repetido e os extratos foram misturados, resultando em 1,0 mL de solução, que foram injetados no cromatógrafo para análise. Foi obtida linearidade no intervalo de concentração de 0,01 – 20 mg L⁻¹, com limite de detecção de 0,004, 0,002 e 0,001 mg L⁻¹ para o TBHQ, BHA e BHT, respectivamente. Os resultados obtidos na pesquisa foram precisos, com um desvio padrão relativo (RSD) menor que 3%, com valores de recuperação entre 94 e 107%.

Li et. al. (2014) determinaram antioxidantes em essências, neste trabalho a amostra foi preparada por extração em ponto nuvem, sendo utilizado o surfactante álcool graxo de éter de polioxietileno AEO-9 como solvente. As medidas foram realizadas por HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD), a operar em modo gradiente de acetonitrila e água contendo 0,1% de ácido acético, sendo que a concentração de acetonitrila variou de 50 a 85% de 0 à 4,5 min, atingiu a concentração de 90% em 6,5 min, e retornou a proporção inicial em 9 minutos de corrida, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Nestas condições foram obtidos índices de recuperação 89 a 103 % para a determinação de PG, BHA, BHT e TBHQ, com um RSD de 2,26 a 5,35 %.

Em outro trabalho, Saad et al. (2007), determinaram PG, TBHQ, BHA e BHT em óleo de comestível, margarina, manteiga e amostras de queijo e pão, utilizando HPLC com gradiente de eluição. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna C18, tendo como fase móvel acetonitrila e água acidificada (ácido acético) 1% e para a quantificação utilizou-se um detector UV no comprimento de onda de 280nm. Os antioxidantes foram extraídos dos alimentos com metanol e acetonitrila (1:1 v/v), submetidos a ultrassom e vortex, sendo os

extratos levados ao freezer para eliminar compostos co-extraídos. A eficiência do preparo da amostra foi comprovada com índices de recuperação entre 85,3 a 108,3% para os 4 antioxidantes. O método proposto foi aplicado em 38 amostras, verificando-se todas as amostras estavam de acordo com a legislação vigente.

Já Cacho e colaboradores (2016), Determinaram TBHQ, BHA e BHT em óleo comestível por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas, utilizando o método de inserção microtubo para injeção e grande volume de amostra. Para tanto, os antioxidantes foram extraídos com uma mistura de acetonitrila e hexano, que foi levada ao ultrassom e centrifugada. 50 μL do extrato foram transferidos para um microtubo de 150 μL , que foi introduzido no vaporizador do CG com temperatura programada. Neste método os compostos voláteis são vaporizados e conduzidos para a coluna cromatográfica, e os compostos não voláteis ficam retidos no microtubo e podem ser descartados. Foram obtidas recuperações entre 86 e 115%, com limites de detecção de 0,03; 0,04 e 0,04 ng g^{-1} para BHA, TBHQ e BHT, respectivamente.

Os métodos eletroanalíticos também são descritos na literatura para a determinação de antioxidantes em alimentos e biodiesel (ARAÚJO et al., 2010; ARAÚJO et al., 2011; CARAMIT et al., 2013; GOULART et al., 2014; LIN; NI; KOKOT, 2013; RAYMUNDO et al., 2007; TORMIN et al., 2010; TORMIN et al., 2012).

Utilizando voltametria de varredura linear, Araújo et al. (2010), desenvolveram um método para TBHQ em biodiesel, utilizando eletrodo pasta de carbono. Neste trabalho os autores utilizaram o surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), que em condições otimizadas aumentou significativamente as correntes de pico anódico da TBHQ, em relação aos valores obtidos com o eletrodo de pasta de carbono sem a presença do surfactante. Para as medidas eletroanalíticas as amostras de biodiesel foram diluídas em metanol até a concentração de 1,5 % (biodiesel:metanol v/v), e adicionadas diretamente na célula eletroquímica. Na aplicação do método proposto as amostras de biodiesel foram enriquecidas com 8000 mg L^{-1} , e a exatidão foi verificada em comparação a técnica de referência (HPLC), com recuperações de 95 a 103,5 %. Neste trabalho foram testados os surfactantes lauril sulfato de sódio (aniônico), CTAB (catiônico) e Triton X-100 (não- iônico), segundo os autores os melhores resultados obtidos com o CTAB ocorreram devido as interações eletrostáticas da molécula de TBHQ e o

surfactante, porém também foram verificados resultados satisfatórios com o tensoativo Triton X-100.

Em outro trabalho, Araújo e colaboradores (2011), buscaram explorar o efeito do uso de surfactantes na determinação voltamétrica de TBHQ em biodiesel, utilizando um eletrodo de gota pendente de mercúrio. Observou-se neste estudo que o uso de surfactantes prejudicou a definição dos voltamogramas de onda quadrada de TBHQ, além de diminuir as correntes de pico, porém a presença do tensoativo Triton X-100 no meio analítico melhorou muito a repetibilidade do sistema na presença da matriz de biodiesel. O método foi aplicado em amostras de biodiesel enriquecidas com 4000, 8000 e 16000 mg L⁻¹ de TBHQ, cujo preparo de amostra foi o mesmo citado no trabalho anterior, rendendo índices de recuperação de 95 a 100,5 %.

Lin, Ni e Kokot (2013), utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro para determinar BHA, BHT e TBHQ simultaneamente em amostras de óleo comestível, por voltametria de varredura linear. Observou-se que com o sensor desenvolvido, ocorreu um aumento significativo nas correntes de pico dos três antioxidantes, bem como o deslocamento dos potenciais de oxidação do BHA e BHT, que no eletrodo de carbono vítreo estavam sobrepostos formando um único pico. Neste trabalho fez-se necessário o tratamento matemático (derivado) dos voltamogramas, buscando obter melhores resultados na quantificação dos três compostos fenólicos, obtendo-se limites de detecção de 0,039; 0,080 e 0,079 µg mL⁻¹, para BHA, BHT e TBHQ, respectivamente. Com o método proposto foi possível determinar os três antioxidantes em amostras de óleo comestível, sendo que a exatidão do método foi comprovada por ensaios de adição e recuperação e comparação com a técnica de referência (HPLC).

Como se pode perceber, a modificação de eletrodos é um procedimento muito utilizado em técnicas eletroanalíticas, para que as respostas dos métodos sejam melhoradas. Outra alternativa para a modificação de eletrodos, é o uso da tecnologia de impressão molecular, uma vez que podem aumentar a seletividade de tais métodos (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005b).

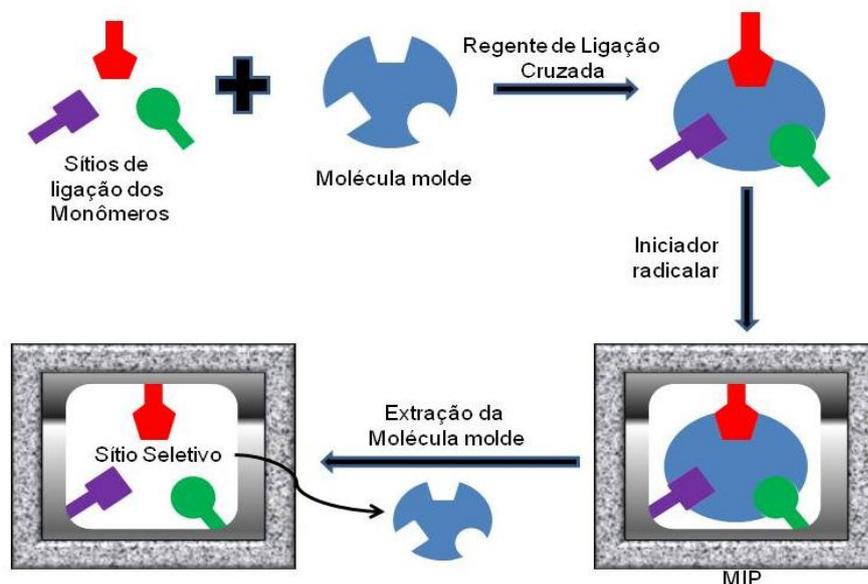
2.2 POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE (MIP)

Os métodos analíticos que reproduzem as reações ocorridas dentro dos sistemas biológicos, tais como a síntese das proteínas, a relação entre antígeno e anticorpo, e reações enzimáticas, se figuram entre os que possuem maior seletividade em Química analítica. Métodos analíticos baseados nestes princípios apresentam alta eficiência, porém são objetos de reflexão, por apresentarem resultados satisfatórios e, ao mesmo tempo, serem influenciados por fatores negativos, como alto custo, necessidade de purificação e sensibilidade a mudanças bruscas nos meios de análise, uma vez que os mesmos não suportam condições diferentes daquelas nas quais foram extraídos, requerendo, portanto, cuidados específicos para o armazenamento (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a).

Um dos maiores desafios da Química analítica é reproduzir as interações ocorridas nos sistemas biológicos, minimizando as desvantagens apresentadas, mantendo-se a mesma seletividade. Por esta razão, estudos têm recorrido à tecnologia de impressão molecular como alternativa de mimetização das características seletivas presentes nos processos citados acima. Além disso, os MIPs possuem como principais vantagens, a fácil manipulação, possibilidades de serem usados na presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos, altas temperaturas e alta pressão (STEVENSON, 1999), onde as biomoléculas perderiam suas propriedades.

Na preparação do MIP utiliza-se uma molécula molde (template) que nada mais é do que o analito que se quer determinar, um monômero funcional que deve ter algum tipo de interação intermolecular com o analito em questão, ambos em um solvente orgânico escolhido criteriosamente para que não haja competição nos sítios de ligação. Neste meio reacional é adicionado um reagente de ligação cruzada, com o intuito de fixar o produto reacional do monômero com o template em uma matriz polimérica rígida. Para dar início a reação de polimerização é utilizado um iniciador radicalar. Após a polimerização, faz-se necessário a retirada da molécula molde, podendo ser através de uso de solvente quando analito e monômero interagem por meio de forças intermoleculares, ou por clivagem química, quando ocorre a ligação covalente (MAYES; WHITCOMBE, 2005). Na Figura 2 estão representadas as etapas de síntese dos MIPs.

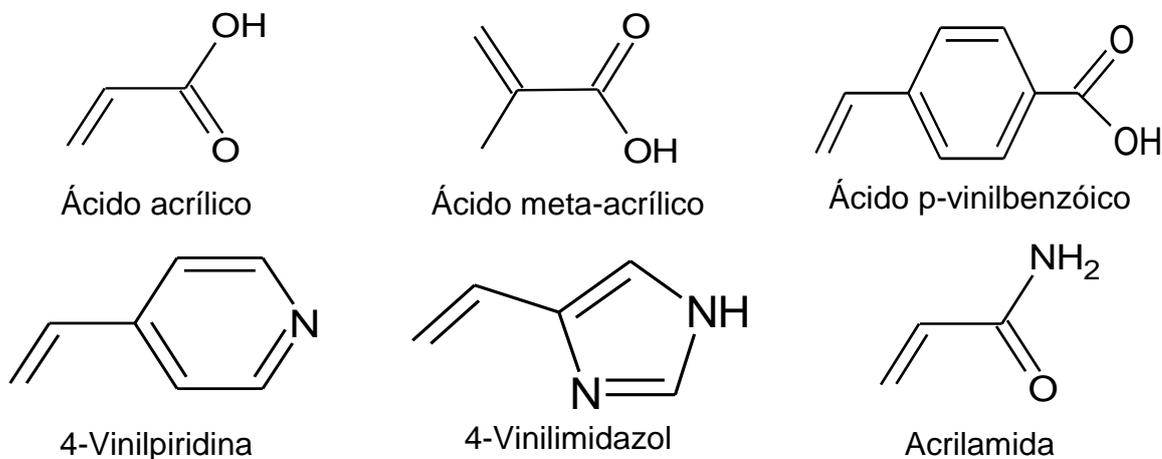
Figura 2 - Representação esquemática da formação do MIP



O polímero formado neste processo apresentará alta seletividade para o template utilizado na síntese, pois as lacunas deixadas na etapa de extração serão preenchidas necessariamente pelo analito em questão. Em muitos casos é possível fazer a separação de enantiômeros com a utilização de MIP, como o relatado no trabalho de Cheong et al. (2013), que faz uma revisão sobre a separação de vários enantiômeros, utilizando a tecnologia de impressão molecular, voltada para várias aplicações, tais como cromatografia, eletrocromatografia capilar, extração em fase sólida (SPE), sensores, entre outras.

A etapa mais importante na produção do MIP é a escolha do monômero que reagirá com a molécula molde, sendo preciso conhecer bem os grupos funcionais presentes nesta molécula, para prever qual o melhor monômero para ser utilizado na síntese. Um dos monômeros mais utilizados para a síntese dos MIPs é o ácido meta-acrílico, porém como já foi abordado anteriormente, esta escolha deve ser feita de acordo com as propriedades do *template*. A Figura 3 mostra alguns monômeros utilizados em sínteses (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a).

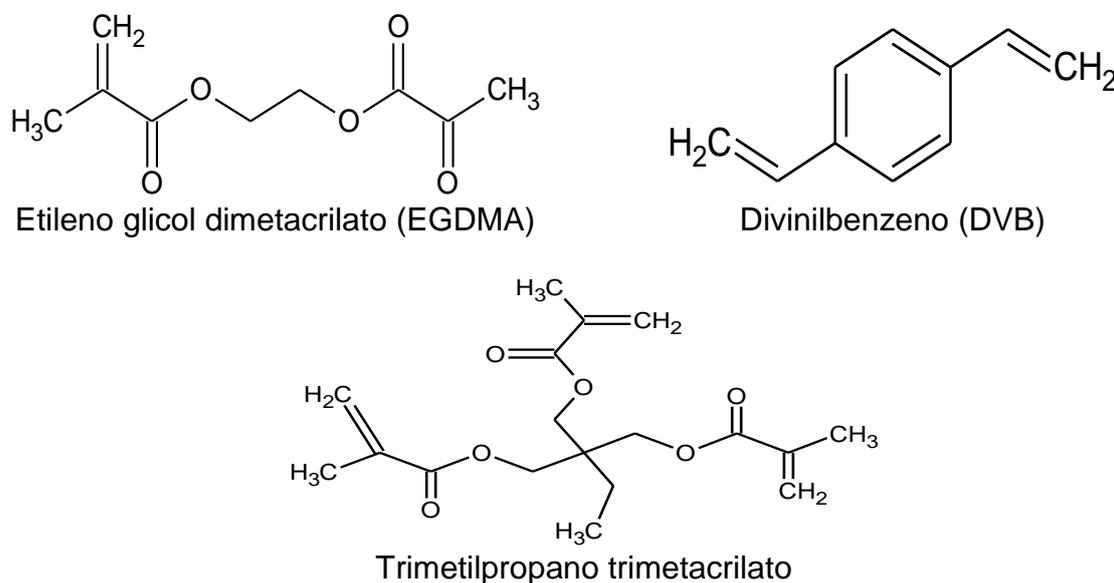
Figura 3 - Estrutura de alguns monômeros funcionais usados na síntese de MIPs



Na síntese do MIP, leva-se em conta o tipo de solvente a ser utilizado, uma vez que além de propiciar a interação entre molécula molde-monômero, o solvente induz a formação de poros, em virtude disso ele é denominado solvente porogênico. Este processo é essencial para a seletividade do polímero formado, logo a sua adição contribui para o aumento da área superficial, facilitando o acesso do analito aos sítios seletivos (MATA et al., 2014; YAN.; ROW, 2006). Outro fator a ser observado na escolha do solvente é o tipo de interação dele com o monômero, com o intuito de evitar a competição com o analito, pois isso pode diminuir a seletividade do MIP.

Para que a interação entre o analito e monômero seja convertida em sítio seletivo, torna-se necessário a fixação dos mesmos em uma base polimérica rígida, para garantir a seletividade do MIP, para isso é necessário adicionar ao meio um reagente de ligação cruzada, que tem a função de dar estabilidade térmica e mecânica ao polímero formado, para que ele possa ser utilizado em vários meios analíticos sem perder sua seletividade (MARESTONI et al., 2013). Na Figura 4 são apresentados reagentes de ligação cruzada utilizados nas sínteses (Alizadeh et al., 2010; CHENG et al., 2006; QIU et al., 2010)

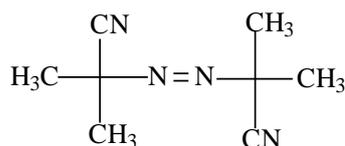
Figura 4 - Fórmula estrutural de reagentes de ligação cruzada empregados na síntese de MIP



Para dar início à polimerização um iniciador radicalar deve ser adicionado ao meio reacional. Na escolha deste reagente leva-se em consideração as condições do meio reacional para evitar a decomposição dos participantes da síntese, pois o iniciador radicalar pode ter ação térmica ou fotoquímica (MIJANGOS et al., 2006).

Os iniciadores radicalares mais comuns são AIBN, azo-bis-dimetilvaléronitrila (ABDV), dimetilacetal de benzíla, peróxido de benzoíla (BPO) e, ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico), sendo que um dos mais utilizado em sínteses é o AIBN (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a), representado na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura molecular do AIBN



São encontrados na literatura vários métodos para preparo de polímeros molecularmente impressos, dentre eles podemos citar os sintetizados por suspensão (FENG et al., 2013), precipitação (BELTRAN et al., 2009; PARDESHI et

al., 2014), polimerização sobre superfície de sílica (ZHAO; HAO, 2013), polimerização em *bulk* (AZODI-DEILAMI; ABDOUSS; SEYEDI, 2010), entre outros, sendo que o último citado é mais conhecido e utilizado, por ser o método que apresenta maior facilidade no preparo (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a).

Os MIP têm se apresentado como uma ótima ferramenta na química analítica devido à sua versatilidade de aplicação, podendo ser aplicados em métodos de pré-concentração, como processos de extração em fase sólida (SPE) (QUESADA-MOLINA et al., 2012; SADEGHI et al., 2013) e microextração em fase sólida (SPME) (HU et al., 2010; QIU et al., 2010), em processos de separação como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (KARIMI et al., 2014; LEE et al., 2010), eletroforese capilar (CE) (MORENO-GONZÁLEZ et al., 2014; ZHANG et al., 2012). Percebe-se também um crescente interesse pelo uso desses polímeros em métodos eletroanalíticos (ALIZADEH et al., 2009; ALIZADEH et al., 2010; SADEGHI; MOTAHARIAN, 2013).

2.3 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

De forma geral, ensaios voltamétricos são realizados através da aplicação de potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência. O eletrodo de trabalho recebe este nome específico porque é nele que as reações de interesse, sejam elas de oxidação ou redução, acontecem. Devido à reação no eletrodo de trabalho, uma corrente é gerada, a qual flui entre este e o eletrodo auxiliar. O sinal analítico gerado e mensurado é dado pela corrente elétrica proveniente da transferência de elétrons pela reação de redução ou oxidação. Com o registro deste sinal, um gráfico de corrente mensurada versus potencial aplicado, denominado voltamograma, é gerado (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

2.3.1 Voltametria Cíclica

Dentre as técnicas voltamétricas mais utilizadas, se encontra a voltametria cíclica. Sua ampla utilização se justifica pelo volume de informações passíveis de serem obtidas através desta técnica, dentre elas, informações termodinâmicas do processo redox, informações sobre a cinética envolvida na

transferência de elétrons na reação química de interesse e sobre possíveis processos de adsorção na superfície do eletrodo (WANG, 2000).

Na voltametria cíclica, a varredura de potencial é aplicada de forma linear em relação ao tempo, permitindo-se definir, para cada experimento em particular, o potencial de início e fim da varredura, bem como o número de ciclos de potencial realizados (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A voltametria cíclica é uma das ferramentas de possível utilização para inferir sobre a reversibilidade redox de um sistema. Quando em um voltamograma cíclico o gráfico apresenta ambos os picos de oxidação e redução de um determinado composto, e estes picos apresentam separação entre o potencial de pico anódico (de oxidação) e o potencial de pico catódico regida pela equação (1), pode-se inferir que este é um sistema reversível (WANG, 2000).

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059 V}{n} \quad (1)$$

onde ΔE_p é a variação de potencial entre os picos de oxidação e redução, E_{pa} é o potencial de pico anódico, E_{pc} é o potencial de pico catódico e n é o número de elétrons envolvidos no processo.

Em um voltamograma cíclico, a relação entre a corrente de pico, seja ela de oxidação ou redução e a concentração do analito estudado, para processos reversíveis, é dada pela equação de Randles-Sevcik, apresentada na equação (2) (WANG, 2000).

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A_e c D^{1/2} v^{1/2} \quad (2)$$

onde n é o número de elétrons envolvidos na reação redox, A_e é a área eletroativa do eletrodo de trabalho (cm^2), D é o coeficiente difusional ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), c é a concentração do analito (mol cm^{-3}) e v a velocidade de varredura (V s^{-1}).

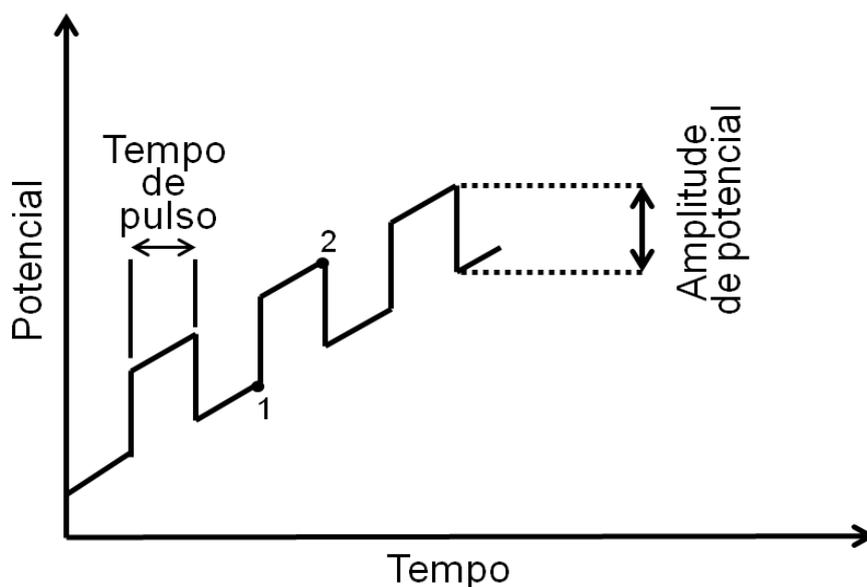
2.3.2 Técnicas de pulso

Propostas por Barker e Jenkin, as técnicas de pulso tem por meta diminuir os limites de detecção dos ensaios voltamétricos, uma vez que, devido à

dinâmica de aplicação dos pulsos, a distância entre as correntes faradáticas e não-faradáticas são consideravelmente aumentadas (SKOOG et al, 2006).

As técnicas de pulso que são mais reportadas na literatura são a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada. Estas técnicas se diferenciam entre si pela forma com que o potencial é aplicado. Na voltametria de pulso diferencial (VPD) os pulsos apresentam amplitude fixa e são aplicados sobrepostos a uma rampa linear de potencial (Figura 6). Nesta técnica, a corrente é mensurada na iminência (I_1) e ao final da aplicação (I_2) de cada pulso, e a resultante ($\Delta I = I_2 - I_1$) é plotada em um gráfico de corrente vs potencial, ao qual é dado o nome de voltamograma de pulso diferencial.

Figura 6 - Representação de um gráfico de aplicação de potencial vs tempo em voltametria de pulso diferencial



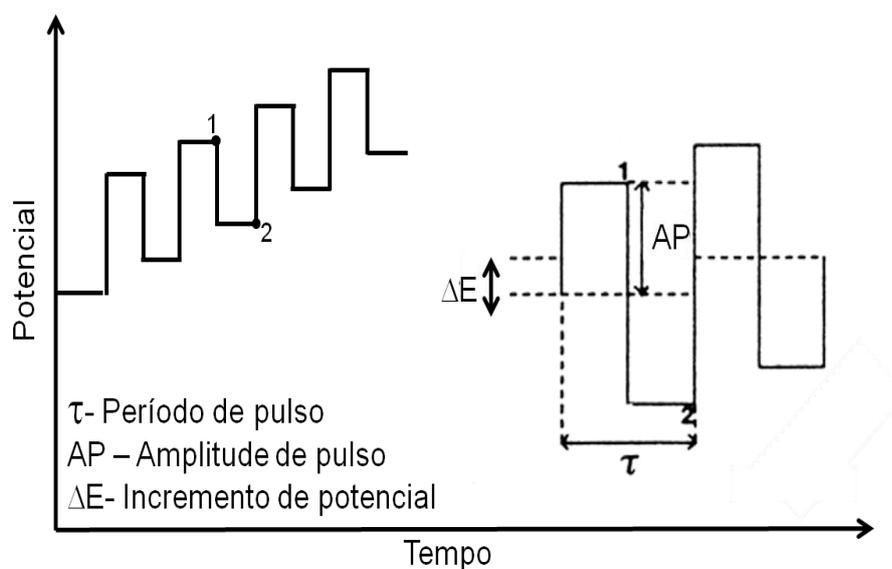
Fonte: WANG, 2000, p. 69 (Adaptado)

Assim como na voltametria cíclica, na voltametria de pulso diferencial, a altura do pico de oxidação ou redução observada é proporcional à concentração do composto analisado (BARD; FAULKNER, 2000; SKOOG et al, 2006). Sua elevada sensibilidade em relação às técnicas voltamétricas aplicadas sem pulso é fundamentada no aumento da corrente faradática (proveniente do processo redox do analito) e na diminuição da corrente capacitiva, decorrente da

dupla camada elétrica formada na interface eletrodo/solução (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

De forma similar, na voltametria de onda quadrada (VOQ), a qual também é uma técnica de pulso, a corrente é mensurada em dois momentos. Entretanto, como nesta técnica são aplicados pulsos anódico e catódico em sequência, a corrente é medida ao final do pulso anódico (I_1) e ao final do pulso catódico (I_2) (Figura 7). Devido à aplicação de um pulso anódico e catódico simultâneos, por vezes o pulso catódico pode reduzir a espécie oxidada pelo pulso anódico (quando a oxidação for reversível), gerando duas correntes faradâicas que ao se somarem, aumentam o sinal analítico.

Figura 7 - Representação de um gráfico de aplicação de potencial vs tempo em voltametria de onda quadrada



Fonte: WANG, 2000, p. 72 (Adaptado)

Em relação à voltametria de pulso diferencial, pode-se dizer que na voltametria de onda quadrada o tempo de análise é consideravelmente reduzido, uma vez que nesta técnica a frequência de aplicação dos pulsos se dá entre 1 à 100 pulsos por segundo (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; WANG, 2000).

2.3.3 Amperometria

Outra dentre as técnicas voltamétricas é a amperometria. Esta técnica se baseia na aplicação de um potencial determinado no eletrodo de trabalho, enquanto a corrente resultante é mensurada e registrada, em forma de gráfico de corrente *versus* tempo (cronoamperograma).

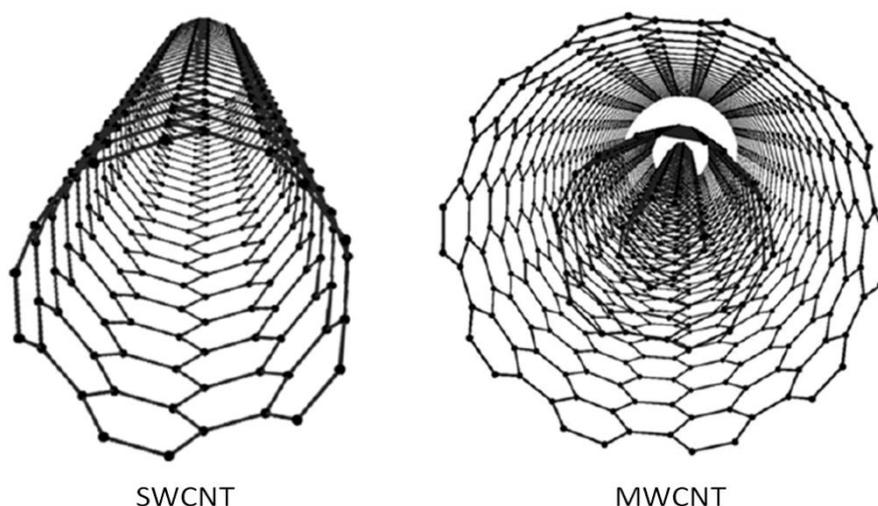
Nas medidas pode-se usar o eletrodo estacionário disposto em uma solução livre de agitação, para elucidar o mecanismo dos processos eletródicos e determinação de área eletroativa e coeficientes difusionais (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; WANG, 2000). A cronoamperometria, também pode ser usada para a determinação de analitos de interesse em amostras (NETO et al., 2011; SARTORI et al. 2011; CARBALLO et al., 2015).

2.4 NANOTUBOS DE CARBONO

Os nanotubos de carbono são estruturas com propriedades únicas, que vem sendo amplamente utilizadas em estudos analíticos, especialmente em eletroanalítica nos últimos anos. Estas estruturas são alótropos sintéticos do carbono, assim como os fulerenos e o grafeno e o carbono amorfo. Assim como no grafite, os nanotubos de carbono são estruturados basicamente por átomos de carbono com hibridação sp^2 , na qual cada átomo de carbono é conectado a outros três, formando um ângulo de 120° em um plano xy, com uma ligação do tipo π perpendicular (no eixo z). Sua estrutura pode ser basicamente descrita como folhas de grafeno enroladas, em dimensões nanométricas, apresentando, por vezes, terminações na forma de semiesferas de fulereno (HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004).

Os principais tipos de nanotubos de carbono são os nanotubos de carbono de parede simples, ou parede única (SWCNT, do inglês *Single-Walled Carbon Nanotubes*) e os MWCNT (Figura 8). Os SWNTC são formados por apenas uma folha de grafeno enrolada, enquanto os MWCNT apresentam duas ou mais folhas concêntricas, com distância entre 0,3 e 0,4 nm (FERREIRA; RANGEL, 2009).

Figura 8 - Representação estrutural dos SWCNT e MWCNT



Fonte: SHARMA, JELEN e TRNKOVA, 2015, p. 1576.

Os primeiro relato da síntese do nanotubo de carbono data de 1991, no trabalho descrito por Iijima (1991), e desde então, os nanotubos de carbono vem sendo amplamente estudados e aplicados nos mais diversos estudos analíticos, devido à suas propriedades.

Em se tratando dos SWNTCs, suas propriedades eletrônicas estão diretamente ligadas à seu tamanho e quiralidade ou helicidade (θ), derivada da forma com que o nanotubo de carbono foi formado. A helicidade do nanotubo de carbono está compreendida entre 0° e 30° , sendo que quando este apresenta ângulo de 0° é denominado “zig-zag”, quando apresenta ângulo entre 0° e 30° é denominado “quiral” e, por fim, quando apresenta ângulo igual à 30° , é denominado “armchair” (HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004). Sobre as formas “zig-zag” e “quiral”, estas possuem caráter ora metálico, ora condutor, enquanto a forma “armchair” possui caráter metálico. Em relação aos MWNTCs, estes apresentam propriedades semelhantes aos nanotubos de carbono de parede simples, devido ao fraco acoplamento observado entre as folhas concêntricas (HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004).

Devido às propriedades mecânicas dos NTCs, tais como dureza e resistência mecânica, flexibilidade estrutural e resistência à pressão, estas

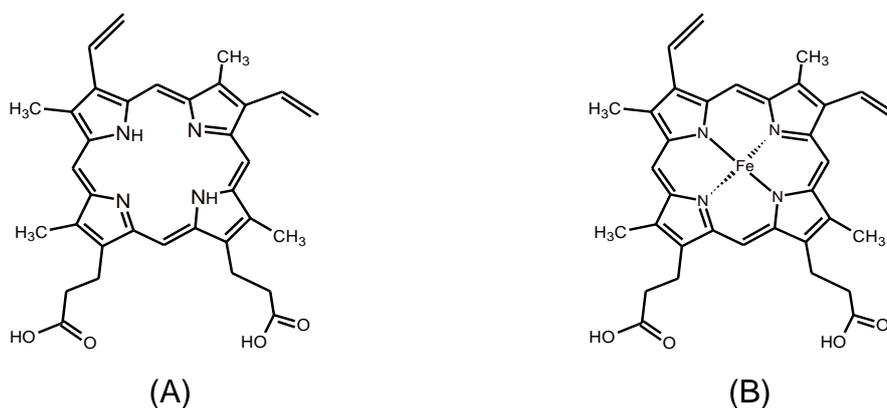
estruturas são potencialmente aplicadas em diversas áreas (SALVETAT et al., 1999).

Em eletroanalítica, especificamente no desenvolvimento de sensores e eletrodos aplicados em análises voltamétricas ou amperométricas, os NTCs têm sido amplamente empregados, devido à sua elevada taxa de transferência de elétrons (HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004) e efeitos eletrocatalíticos (FERREIRA; RANGEL, 2009). São reportados na literatura científica trabalhos que utilizam NTCs na composição de biosensores (LIU; YANG; LIU, 2012; ZHANG et al., 2012; NENKOVA et al., 2010; JANEGITZ et al., 2011), eletrodos modificados com filmes contendo NTCs dispersos (BRAHMAN et al. 2016), MIPs contendo NTCs em sua estrutura (PRASAD et al., 2010; ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2011), além de eletrodos de pasta de NTCs (DUARTE; KUBOTA; TARLEY, 2012; GORLA, 2016).

2.5 PROTOPORFIRINAS

As protoporfirinas (Figura 9 (A)) são derivados das porfirinas, que exercem papel fundamental no metabolismo dos animais (SEYHAN et al., 2008). Elas apresentam em sua estrutura grupos vinílicos ligados aos quatro anéis pirrol do macrociclo porfirínico, o que possibilita a utilização destes compostos na síntese de polímeros molecularmente impressos (OLIVEIRA, 2013). Por conter em sua estrutura extenso sistema de elétrons descentralizados as protoporfirinas possuem propriedades quelantes, favorecendo sua ligação com metais, dando origem as metaloporfirinas, como por exemplo, a protoporfirina de ferro (Hemina) (Figura 9 (B)) (DINIZ, 2013).

Figura 9 – Fórmula estrutural da (A) Protoporfirina e (B) Protoporfirina de ferro



Metaloporfirinas são compostos organometálicos que devido suas propriedades físico-químicas tem sido aplicados em diferentes sistemas eletroquímicos, como sensores catalíticos (NETO et al., 2011) ou em sistema ópticos, como reagentes cromogênicos na determinação de metais por espectrofotometria UV/Vis (KYLIAN, K.; PYRZINSKA, K., 2003). Essa capacidade de ligação das protoporfirinas com diferentes metais tem sido muito explorada e percebe-se pela literatura não só o aumento, mas também a ampliação para a determinação de diferentes moléculas ou da funcionalização de diferentes materiais (JUROW et al., 2010).

Nos últimos anos a utilização das porfirinas e nanotubos têm atraído interesse por parte de pesquisadores, em especial devido às propriedades ópticas do nanomaterial híbrido. Satake et al. (2005), relatam a interação não covalente de nanotubos de carbono com porfirinas por condensação de formilpiridinas e pirinas. O anel porfirínico se liga a parede do nanotubo por forças de Van der Waals, e a interação do orbital $\pi-\pi$ do anel porfirínico e da superfície do grafite possibilita a transferência eletrônica de carga.

Carballo e colaboradores (2015) utilizaram o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de um nanocompósito de Poly[Ni(II)Protoporphyrin IX] e MWCNT para a detecção amperométrica de aminas alifáticas de cadeias longas modificadas com ferroceno. Os estudos de impedância eletroquímica confirmaram que o filme diminuiu a resistência a transferência de elétrons em relação ao carbono vítreo sem modificação. O sensor desenvolvido foi acoplado ao HPLC como detector amperométrico para a determinação das aminas alifáticas em meio hidrofóbico eliminando os efeitos da passivação. Seguindo essa mesma linha, Zou et al., (2015), descrevem o desenvolvimento de um método eletroquímico baseado na funcionalização de grafeno com hemina, para a modificação da superfície do eletrodo de carbono de vítreo. O sensor foi aplicado com sucesso na determinação simultânea e seletiva de ácido ascórbico, dopamina e ácido úrico em amostras de urina e soro, com limite de detecção de 0,3, 0,17 e 0,17 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

2.6 HEMINA, MWCNT E MIP, POTENCIALIDADES EM ELETROANALÍTICA

Os métodos eletroanalíticos são de grande importância para a química analítica, pois possibilitam uma maior velocidade de análise em relação a outros métodos, são portáteis, podendo ser utilizados *in loco*, além de apresentarem boa sensibilidade, fácil manutenção e custo relativamente baixo. Uma ótima alternativa para modificação de eletrodos é a aplicação dos MIP em sua superfície, conferindo aos mesmos, elevado grau de reconhecimento, como o apresentado nos biosensores, com a vantagem de serem altamente estáveis, ou seja, podem ser aplicados em meios analíticos onde os biosensores não resistiriam (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005a).

Estes sensores mimetizam o comportamento de biosensor, e levam a denominação de sensores biomiméticos (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005b). Vários autores citam utilização de MIP em sensores eletroanalíticos.

Como o relatado no trabalho de Alizadeh et. al. (2010), que sintetizaram um MIP para a determinação de cafeína, tendo ácido metacrílico como monômero. O MIP foi misturado com grafite para formação de uma pasta de carbono e para a determinação foi utilizada voltametria de pulso diferencial, que após a otimização, obteve boas respostas, quantificando uma faixa de $6,0 \times 10^{-8}$ a $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L, com um limite de detecção de $1,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O sensor foi aplicado na quantificação de cafeína em bebidas e chá.

Em outro trabalho, Alizadeh et. al. (2009), construíram um sensor voltamétrico seletivo para p-nitrofenol, utilizando MIP e pasta de carbono, através do qual após a otimização obteve boa seletividade com faixa linear dinâmica de 8×10^{-9} a 5×10^{-6} mol L⁻¹, com limite de detecção de 3×10^{-9} mol L⁻¹.

Já Sadeghi e Motaharian (2009), prepararam um polímero impresso com sulfadiazina, que foi misturado à pasta de carbono para a modificação do eletrodo de trabalho, utilizando análise voltamétrica. A determinação da sulfadiazina foi feita por voltametria de pulso diferencial, numa faixa de trabalho de 2.0×10^{-7} a 1.0×10^{-4} mol L⁻¹.

Conforme mencionado, a utilização dos MIP em métodos analíticos apresenta diversas vantagens em relação àqueles baseados em processos enzimáticos (biológicos), no entanto o termo biomimético, deve ser utilizado com cautela, pois em determinadas situações, o MIP apresenta cavidades seletivas a

molécula alvo, mas pode não apresentar ação catalítica, como os biosensores enzimáticos. Com base no exposto, Cheng et. al. (2004) propôs a síntese de um MIP para reproduzir a ação da enzima peroxidase, na determinação de ácido homovanílico, utilizando os monômeros acrilamida, 4-vinilpiridina para a interação com o analito e a protoporfirina de ferro como centro catalítico do polímero. Neste caso o ferro presente na molécula é oxidado de Fe (III) para Fe (IV) na presença de H_2O_2 , que quando entra em contato com o analito atua como o agente oxidante, na sequência o analito oxidado sofre um processo de dimerização, emitindo forte fluorescência. Neste trabalho, o polímero não foi imobilizado na superfície de um eletrodo, mas gerou pressupostos para trabalhos posteriores.

Em outro trabalho Cheng e colaboradores (2006), mencionam que além de servir como centro catalítico, a hemina desempenha importante papel no reconhecimento molecular.

Sartori et. al. (2011), sintetizaram um MIP, pelo método de *bulk*, utilizando como monômero o ácido metacrílico e protoporfirina de ferro (hemina) como sítio catalítico, para a determinação de adrenalina. No experimento foi utilizado um sistema de injeção em fluxo, com uma coluna empacotada com o MIP. Inicialmente H_2O_2 foi percolado na coluna para oxidar a hemina presente no polímero. Na sequência a amostra foi introduzida no sistema, e ao passar pela coluna oxidou-se ao entrar em contato com o sítio ativo da hemina (oxidado), sendo conduzida até uma célula amperométrica, em seguida a adrenalina foi reduzida na superfície do eletrodo gerando o sinal analítico. O método apresentou faixa de trabalho entre 10 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 5,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Já Neto et. al. (2011), desenvolveram um polímero impresso para determinação de 4-aminofenol em águas de rio, pelo método de precipitação, também utilizando o ácido metacrílico como monômero, e a hemina como centro catalítico. Neste trabalho o MIP foi imobilizado na superfície de um eletrodo de carbono vítreo, para análise amperométrica, conseguindo boa repetibilidade e seletividade, com uma faixa linear de quantificação de 10,0 – 90,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

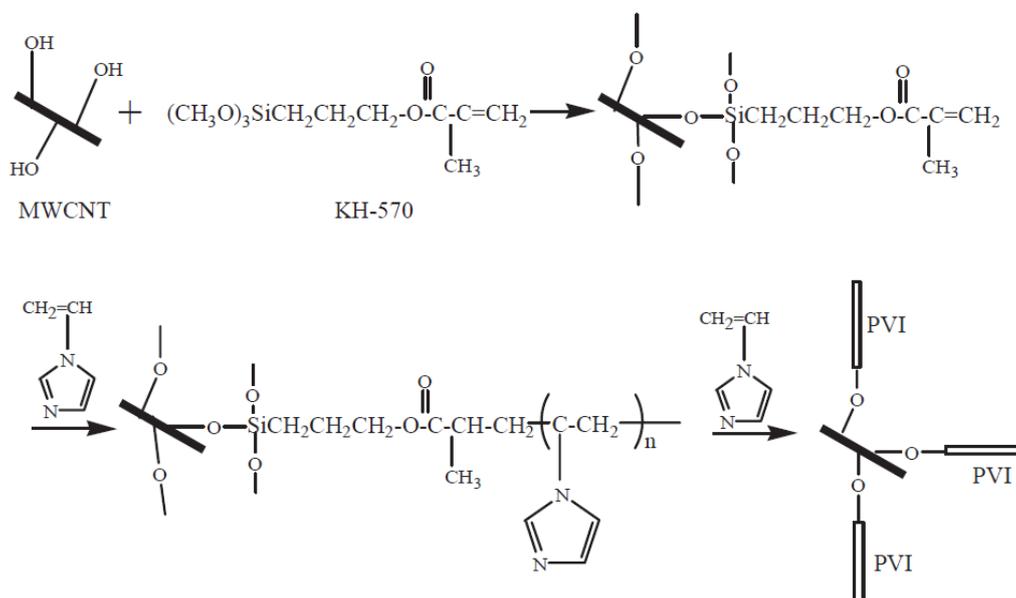
Conforme abordado anteriormente, alguns trabalhos utilizam pasta de carbono para a fixação do MIP no eletrodo, com o intuito de melhorar o transporte de elétrons até a superfície do transdutor, melhorando assim a qualidade do sinal analítico. Também há na literatura trabalhos utilizando nanotubos de carbono (em

pasta, ou funcionalizado), em virtude da sua capacidade de transferência de elétrons (HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004) e efeitos catalíticos (FERREIRA; RANGEL, 2009), na determinação de diversos analitos por métodos eletroanalíticos (WONG et al., 2015). A formação de pasta de carbono com MIP, apesar de ser uma estratégia simples, pode limitar a seletividade e sensibilidade do dispositivo eletroquímico, pois a quantidade de MIP empregada é substancialmente inferior ao material carbonáceo.

Neste sentido, a fim de propiciar uma distribuição mais homogênea entre os nanotubos de carbono e os polímeros molecularmente impressos, alguns autores sugerem que o processo de polimerização ocorra na superfície dos nanotubos de carbono, para isso é necessária a modificação deles com grupos vinílicos, para que o polímero possa ligar-se covalentemente aos nanotubos, recobrando sua superfície. Como os NTCs possuem área superficial elevada e, considerando que a reação de polimerização do MIP na superfície do NTC ocorra numa escala nanométrica, observa-se que neste tipo de estratégia o acesso aos sítios seletivos do MIP é facilitado em comparação os eletrodos de pasta de carbono.

Esta estratégia foi adotada por Yang et. al. (2005), que promoveram a oxidação dos MWCNT, com uma mistura de H_2SO_4 : HNO_3 (3:1), na sequência efetuaram a reação dos MWCNT oxidados com o agente de acoplamento KH570 (propil-metacrilatotrimetoxisilano), para disponibilizar o grupo vinílico e, posteriormente realizaram a reação de polimerização do MIP com vinil-imidazol. Os autores relatam que além de melhorar a dispersão do material em solventes orgânicos, este tipo de síntese abre novas alternativas para o desenvolvimento de materiais funcionais, com novas propriedades ópticas, magnéticas, elétricas e mecânicas. A Figura 10 apresenta uma representação esquemática da síntese realizada por Yang e colaboradores.

Figura 10 - Representação esquemática da síntese de MIP de vinil-imidazol na superfície de MWCNT.



Fonte: YANG et al., 2005, p. 2839.

Em outro trabalho Kim et al. (2009) oxidou os nanotubos de carbono com uma mistura de brometo de tetrapropilamônio e permanganato de potássio, em meio ácido à temperatura ambiente. Após a oxidação os MWCNT-OH foram funcionalizados com metacriloxipropiltrimetoxissilano, o qual posteriormente foi polimerizado com 4-vinilpiridina. O compósito obtido na síntese ainda foi recoberto com sílica, por reação sol-gel. Neste trabalho Kim e colaboradores ainda extraíram os nanotubos da matriz de sílica por calcinação, formando assim nanotubos de sílica. Este tipo de síntese também pode ser uma alternativa viável para a modificação de eletrodos.

Mediante ao exposto, a possibilidade de explorar os efeitos sinérgicos da associação da tecnologia de impressão molecular com hemina e os MWCNT se figura uma ótima alternativa para a modificação de eletrodos em análises voltamétricas, essenciais para desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais sensíveis e seletivos.

Por fim, as alternativas de desenvolvimento de materiais para a modificação de eletrodos citadas sucintamente ao longo desta revisão, mostram-se promissoras para o desenvolvimento de novos métodos eletroanalíticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de um nanocompósito baseado em poli(ácido metacrílico-hemina) molecularmente impresso suportados em MWCNT, bem como sua utilização na construção de um sensor eletroquímico para a determinação de antioxidantes em amostras lipídicas e Biodiesel.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar e caracterizar um Compósito Nanotubos de Carbono e Poli(ácido metacrílico-hemina) Molecularmente Impresso para TBHQ;

Desenvolver o método eletroanalítico e investigar as melhores condições analíticas para a determinação dos antioxidantes em matrizes lipídicas e biodiesel;

Estudar a estabilidade e reprodutibilidade do preparo do sensor;

Avaliar a formação dos sítios seletivos do MIP, e comprovar a seletividade do material;

Determinar as figuras de mérito do método proposto;

Verificar a exatidão do método desenvolvido, comparando os resultados obtidos com o sensor em relação aos encontrados com a técnica de referência HPLC;

Aplicar o método proposto em amostras reais, tais como óleo de soja, margarina, maionese e biodiesel.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Palm Instruments BV[®] PalmSens (Houten, Holanda), controlado pelo software Palm Instruments BV[®] PSTrace 4.4 (Houten, Holanda) equipado com célula eletroquímica contendo um eletrodo de referência Ag/AgCl (em KCl 3,0 mol L⁻¹), um contra-eletrodo de fio de platina e um eletrodo de trabalho de carbono vítreo modificado com filme de MIP-MWCNT. Com intuito de avaliar a resposta voltamétrica do sensor modificado com MIP-MWCNT frente à molécula de TBHQ, diferentes eletrodos foram também testados, a saber: eletrodo de carbono vítreo sem modificação, eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP (MIP sem MWCNT), eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP-MWCNT, mas sem hemina (MIP-MWCNT sem hemina) e eletrodo de carbono vítreo modificado com NIP-MWCNT (nanocompósito sem impressão química). As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab[®] PGSTAT-101 (Eco Chemie BV, Utrecht, Holanda), e os diagramas de Nyquist foram registrados na faixa de 100 KHz a 10 mHz de frequência.

Para a caracterização espectroscópica dos materiais, foram utilizados um espectrofotômetro do modelo Shimadzu[®] FT-IR 8300 (Tóquio, Japão), operando entre 4000-400 cm⁻¹ para identificar os grupos funcionais presentes nos materiais e um espectrofotômetro Raman DeltaNu[®] Advantage532, equipado com feixe de 532 nm e resolução de 8 cm⁻¹, operando na faixa espectral de 200 cm⁻¹ a 3400 cm⁻¹, para analisar alterações gráficas nos nanotubos de carbono após os processos de oxidação e funcionalização. A estabilidade térmica dos nanocompósitos foi avaliada à partir de análises termogravimétrica usando um analisador termogravimétrico Perkin Elmer[®] TGA 4000 (Massachusetts, USA), com rampa de aquecimento de 30 a 900 °C e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, em atmosfera inerte (N₂).

As análises morfológicas foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio JEOL[®] JSM 300-LV (Tóquio, Japão) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) usando um microscópio JEOL[®] JEM

1400 (Tóquio, Japão) com uma voltagem de aceleração de 120 kV. Antes das análises de MEV os materiais foram previamente revestidos com uma fina camada de ouro, usando o equipamento Bal-Tec MED 020. Para as análises de MET, os materiais foram dispersos em etanol e submetidos ao ultrassom por 20 minutos, na sequência, a suspensão foi depositada na superfície de telas de cobre e seca sob vácuo.

As análises de área superficial, tamanho e volume de poros foram realizadas empregando um analisador Quantachrome[®] Nova 1200 e (Boynton beach, USA), sendo os dados de área superficial calculados a partir do modelo de BET (Brunauer, Emmett, Teller), e o volume e tamanho de poros determinados pelo modelo de BJH (Barrett, Joyner, Halenda). Um pHmetro Metrohm[®] 827 pH lab foi utilizado para as medidas de pH.

As análises de HPLC foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido Shimadzu[®] modelo LC-20AT, equipado com bomba de gradiente, detector de arranjo de diodos UV-VIS operando em 280,0 nm, injetor com alça de amostragem de 20 μ L, e uma coluna cromatográfica (C18) Shimadzu[®] CLC-ODS com dimensões de 250 mm x 4,6 mm, empacotada com partículas de 5 μ m, protegida por uma coluna de guarda (Phenomenex[®], 4,0 mm x 3,0 mm e tamanho de partículas de 5 μ m)

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para a síntese dos materiais, preparo do sensor e experimentos voltamétricos foram empregados os seguintes reagentes de grau analítico sem purificação prévia: tolueno (99,9%), hidroquinona (99%), viniltrimetoxissilano (VTMS) (98%), ácido metacrílico (MAA) (99,5%), trimetilol propano triacrilato (TRIM) (99,9%), 2,2'-azobis-isobutironitrila (AIBN) (98%), terc-butil hidroquinona (TBHQ) (97%), butil-hidroxianisol (BHA) (98,5%), paracetamol (99%), pirocatecol (99%), propil galato (98%), cloridrato de adrenalina (99%), cloridrato de dopamina (99%), NAFION[®] 5% (solução de alcoóis alifáticos em água), metanol (99,9%) e ácido acético (99,8%) adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). O ácido sulfúrico (95-99%) e o ácido nítrico (65%) foram obtidos junto a Vetec (Brasil). Os MWCNT foram adquiridos da empresa CNT Co. Ltda. Yeonsu-Gu, Incheon, Korea 93%, diâmetro de 10-40 nm e comprimento de 5-20 μ m, A N,N- dimetilformamida (DMF) (99,8%), o ácido L-ascórbico (99%) e a protoporfirina de ferro (hemina) (98%) foram obtidos da

empresas Fmaia (Brasil), Synth (Brasil) e Fluka (Alemanha), respectivamente. Solução tampão Tris-HCl foi preparada a partir do sal (99.8%, Merck, Alemanha) e dissolução em água. Tampão Britton-Robinson (BR) foi obtido a partir da mistura de ácido bórico (99%, Chemco, Brasil), ácido acético (Sigma Aldrich) e ácido fosfórico (85 %, Merck) na mesma concentração. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida pelo sistema de purificação Milli-Q® (Bedford, USA) com resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. As amostras de óleo de soja, margarina e maionese foram obtidas em supermercados locais, enquanto que o biodiesel de soja foi fornecido pelo Laboratório de Controle de Qualidade dos Combustíveis localizado no Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina.

4.3 SÍNTESE DO POLÍMERO NA SUPERFÍCIE DOS MWCNT

Inicialmente, 300,0 mg de MWCNT foram adicionados a um balão de fundo redondo contendo 40,00mL de uma mistura ácido nítrico: ácido sulfúrico (3:1, v/v) e mantidos sob refluxo por 2 horas em banho de óleo à temperatura de 65 °C (Figura 11). Após, os MWCNT oxidados (MWCNT-OXI) foram lavados exaustivamente com água ultrapura para remoção da acidez (pH próximo de 7,0), secos em estufa a 60°C e reservados para a próxima etapa da síntese (CORAZZA et al., 2012).

Figura 11 – Sistema utilizado para a oxidação dos MWCNT.



Para a funcionalização, 150,0 mg de MWCNT-OXI dispersos em 30,00 mL de tolueno e 24,28 mmol de VTMS com 1% de hidroquinona (m/m)

solubilizados em 20,00 mL de tolueno foram adicionados em um balão de fundo redondo de 3 vias sob agitação (Figura 12). Uma das vias laterais do balão foi selada com rolha, na via central foi colocado um condensador de refluxo e a outra via foi utilizada para borbulhar gás nitrogênio (N_2) por 10 minutos, tornando a atmosfera reacional inerte. Após, todas as saídas foram seladas e o sistema foi mantido sob refluxo em banho de óleo a 100 °C por 6 horas (KIM et al., 2009). A adição de VTMS tem intuito de disponibilizar grupos vinílicos para a polimerização na superfície do MWCNT (KIM et al., 2009; YANG; PU; YIN, 2005) e, a adição da hidroquinona evita a oxidação destes grupos. Os MWCNT funcionalizados (MWCNT-VN) obtidos na síntese, foram lavados com etanol para retirar o excesso de reagentes e secos em estufa à 50 °C por 6 horas.

Figura 12 – Sistema utilizado para a funcionalização dos MWCNT-OXI.



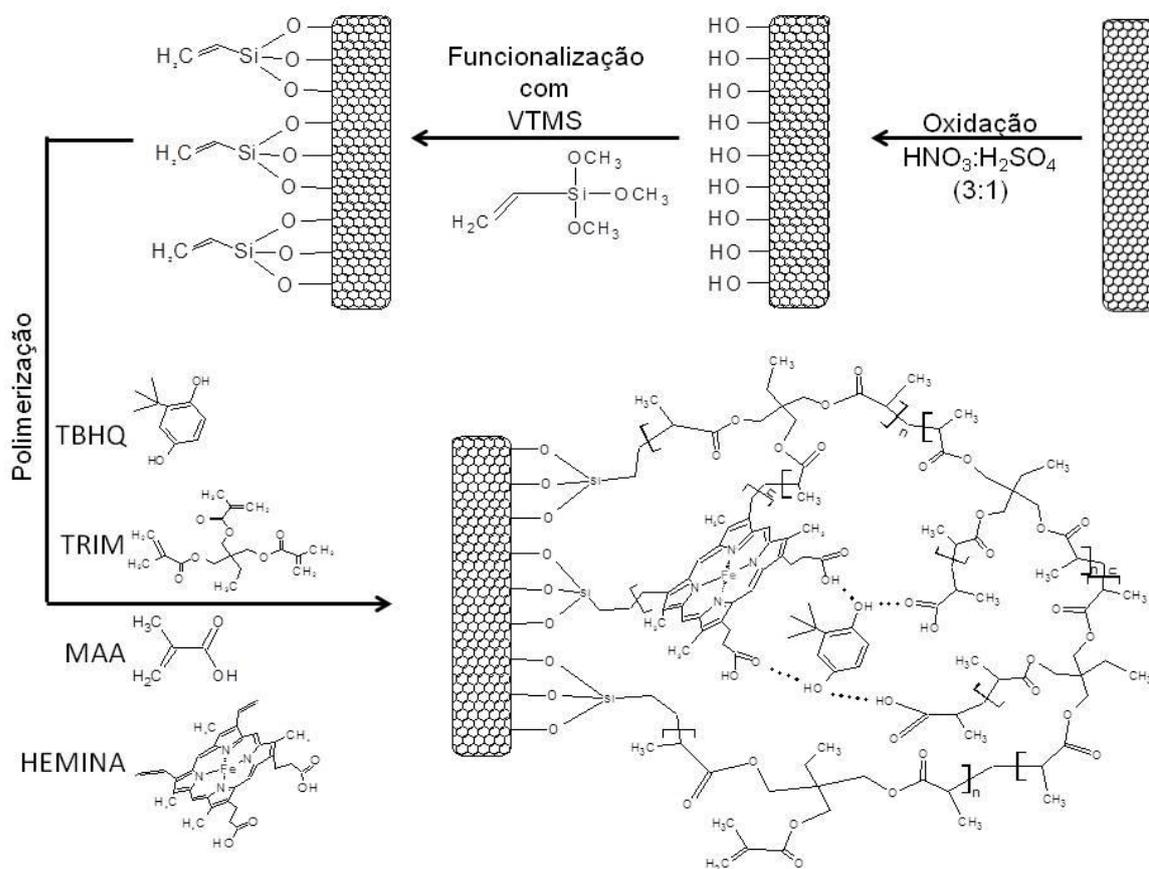
Para a síntese do polímero na superfície dos MWCNT, 10,00 mg de MWCNT-VN dispersos em 20,00mL de tolueno, 5,80 mmol do monômero funcional (MAA), 1,32 mmol do agente de ligação cruzada (TRIM), 0,097 mmol do comonômero hemina e 0,30 mmol da molécula molde (TBHQ) foram adicionados num balão de fundo chato. A mistura foi agitada manualmente e, posteriormente, foram adicionados 0,48 mmol de AIBN. O frasco foi fechado hermeticamente com atmosfera inerte (N_2) e aquecido em banho de óleo à 60° C por 24 horas sob agitação constante (Figura 13) (KIM et al, 2009; YANG et al., 2005; NETO et al., 2011; SARTORI et al., 2011).

Figura 13 – Sistema utilizado para a síntese do nanocompósito.



O nanocompósito obtido na síntese (MIP-MWCNT) foi lavado com uma mistura de metanol: ácido acético (4:1, v/v), para remoção da molécula molde e seco em estufa a 60 °C por 12 horas. O mesmo procedimento foi utilizado para a síntese do material sem a molécula molde (NIP-MWCNT), para o polímero impresso sem a presença dos MWCNT (MIP-Hemina sem MWCNT) e para o MIP sem hemina (MIP-MWCNT sem hemina). A Figura 14 apresenta o esquema representativo das etapas de síntese do nanocompósito.

Figura 14 - Representação esquemática das etapas da síntese do nanocompósito MIP-MWCNT.



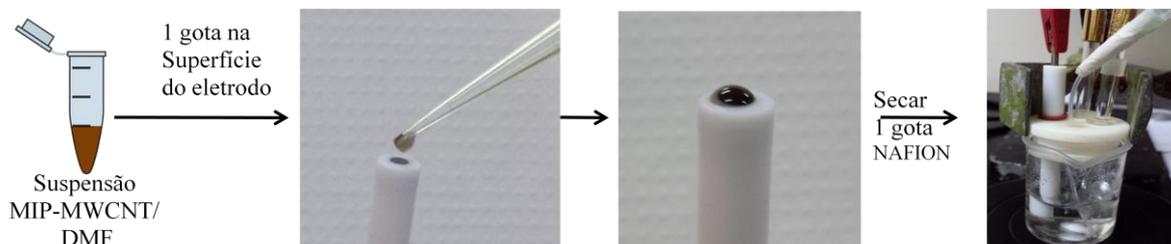
4.4 PREPARO DOS ELETRODOS

4.4.1 Eletrodos de carbono vítreo modificados com MIP-MWCNT, NIP-MWCNT, MIP-Hemina sem MWCNT e MIP-MWCNT sem hemina

Dez microlitros de uma suspensão de MIP-MWCNT em DMF (6 mg mL^{-1}) foram adicionados sob a superfície do eletrodo de carbono vítreo. Em seguida o eletrodo foi levado a uma estufa a 35°C para evaporação do solvente DMF. Após a secagem, adicionou-se $7,0 \mu\text{L}$ de solução de NAFION[®] 1,6 % (diluído em DMF) sobre o filme formado para melhorar sua fixação na superfície do eletrodo (Figura 15). Para condicionar o eletrodo modificado, 60 ciclos voltamétricos foram realizados em solução de Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,00) numa janela de potencial de 0,3 à -0,7 V com velocidade de varredura de 70 mV s^{-1} . Os eletrodos modificados com o NIP-MWCNT, MIP-Hemina sem MWCNT e MIP-MWCNT sem hemina foram preparados

de forma análoga ao MIP-MWCNT, assim como seu condicionamento. O mesmo procedimento de preparo dos eletrodos foi utilizado no estudo de concentração de suspensão.

Figura 15 – Esquema representativo do preparo do sensor



4.4.2 Eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de MWCNT (CV-MWCNT)

Dez microlitros de uma suspensão de MWCNT em DMF ($0,08 \text{ mg mL}^{-1}$) foram adicionados ao eletrodo de carbono vítreo. Posteriormente, o eletrodo foi levado a uma estufa a 35°C para evaporação do solvente DMF. Na sequência, $7,0 \mu\text{L}$ de NAFION[®] 1,6% foram adicionados ao eletrodo para fixação do filme de MWCNT. O eletrodo de CV-MWCNT, também foi condicionado conforme o procedimento anterior. Salienta-se que a concentração de $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizada na suspensão de MWCNT refere-se a quantidade de MWCNT presente na suspensão de MIP-MWCNT (6 mg mL^{-1}).

4.5 PROCEDIMENTO ELETROANALÍTICO

As medidas eletroanalíticas foram realizadas em célula eletroquímica com capacidade de $15,00 \text{ mL}$. Realizaram-se os estudos iniciais por voltametria cíclica com velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} , incremento de potencial de 5 mV e eletrólito suporte Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,00. Em condições otimizadas, as medidas foram realizadas em H_2SO_4 $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, por voltametria de pulso diferencial com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} , tempo de modulação de 25 ms e amplitude de pulso de 100 mV .

4.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A separação cromatográfica foi realizada por gradiente de eluição, sendo a fase móvel constituída por acetonitrila (A) e ácido acético 1% (B). No início da corrida a proporção inicial foi 70% de A e 30% de B, que variou entre 30% e 95% ao longo de 5,0 minutos, chegando em 100 % nos outros 4 minutos. Na sequência foram retomadas as condições iniciais por 2 minutos, para estabilizar o sistema.

Nestas condições os tempos de retenção foram de 4 min para a TBHQ e de 6,34 min para o BHA.

4.7 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA SUSPENSÃO

O efeito da concentração da suspensão do nanocompósito no comportamento voltamétrico do TBHQ foi avaliado em diferentes níveis de concentrações, a saber: 0,50, 1,00, 3,00, 6,00, 10,00 e 15,00 mg mL⁻¹ do MIP-MWCNT em DMF. O procedimento de preparo do eletrodo foi idêntico aos anteriores já mencionado. O estudo foi realizado por voltametria cíclica, com 30 mV s⁻¹ de velocidade de varredura e Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0) como eletrólito suporte.

4.8 PREPARO DE AMOSTRAS

Para o preparo das amostras de óleo de soja foi adotada a técnica de extração líquido-líquido com adaptação do procedimento reportado por Saad et al. (2007).

Cinco gramas da amostra foram adicionadas a um tubo de polipropileno de 50,00 mL contendo 22,5 mL de uma mistura de metanol/acetonitrila (1:1, v/v). A mistura foi levada a um banho ultrassônico (40 kHz) e mantida por 15 minutos. Após, a mistura foi agitada em vortex por 15 segundos e centrifugada a 1600 rpm durante 10 minutos. Uma alíquota de 10,00 mL foi retirada do sobrenadante e adicionada a um tubo de polipropileno de 15,00 mL e mantida em freezer por 2 horas. Desta solução, 2,00 mL foram coletados, evaporados em fluxo de N₂, retomados em 10,00 mL de H₂SO₄ 0,15 mol L⁻¹, filtrados em membrana de nylon[®] de 0,45 µm e transferidos para célula eletroquímica. Para as análises de HPLC, foi tomado 1,0 mL do sobrenadante, o qual foi evaporado sob fluxo de N₂,

seguido da adição de acetonitrila e solução aquosa de ácido acético 1 % (70:30%), filtrado em membrana de nylon[®] de 0,45 µm e injetado diretamente no sistema cromatográfico.

Para os ensaios de adição e recuperação em óleo de soja as amostras foram enriquecidas com padrões de TBHQ e BHA preparados em álcool isopropílico até a concentração final de 200 mg Kg⁻¹ e analisadas por voltametria.

O tratamento das amostras de maionese e margarina foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Medeiros, Rocha-Filho e Fatibello-Filho (2010) com algumas modificações. Aproximadamente 1,0 g da amostra foi dissolvida em 1,0 mL de etanol em um frasco de polipropileno de 15,0 mL. A mistura foi agitada em vortex por 5 minutos, na sequência a amostra foi centrifugada a 1600 rpm por 10 minutos. O procedimento foi repetido por 3 vezes, sendo os extratos recolhidos e evaporados sob fluxo de N₂, seguida pela adição de 10,0 mL de H₂SO₄ 0,15 mol L⁻¹, a qual foi filtrada em membrana de nylon[®] de 0,45 µm e transferida para a célula eletroquímica. Nas análises por HPLC, foram adicionados 5,0 mL de acetonitrila e de ácido acético 1 % (70:30%), filtrados em membrana de nylon[®] 0,45 µm e injetados no sistema cromatográfico.

O tratamento das amostras de biodiesel foi realizado de acordo com os procedimentos adotados por Medeiros, Rocha-Filho e Fatibello-Filho (2010) e Caramit e colaboradores (2013; 2015), com pequenas modificações. Dois gramas de biodiesel de soja foram pesados em um frasco de polipropileno de 15,0 mL e foram adicionados 2,0 mL de metanol. A mistura foi agitada em vortex por 5 minutos, seguido da adição de 2,0 mL de acetonitrila e ácido acético 1% (70:30%), na sequência a mistura foi homogeneizada em vortex por 30 segundos, centrifugada a 1600 rpm por 10 minutos e armazenada em freezer por 10 minutos. Após 3,5 mL do sobrenadante foram evaporados sob fluxo de N₂, retomados em 10,0 mL de H₂SO₄ 0,15 mol L⁻¹, filtrados em membrana de nylon[®] 0,45 µm e transferidos para a célula eletroquímica. Para as medidas cromatográficas, dois gramas de biodiesel de soja foram misturados a 3,0 mL de metanol num frasco de polipropileno de 15,0 mL e agitados em vortex por 5 minutos, seguido pela adição de 5,0 mL de acetonitrila e ácido acético 1% (70:30%). A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos, centrifugada a 1600 rpm durante 10 minutos e levada ao congelador por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de nylon[®] 0,45 µm e injetado diretamente no sistema cromatográfico.

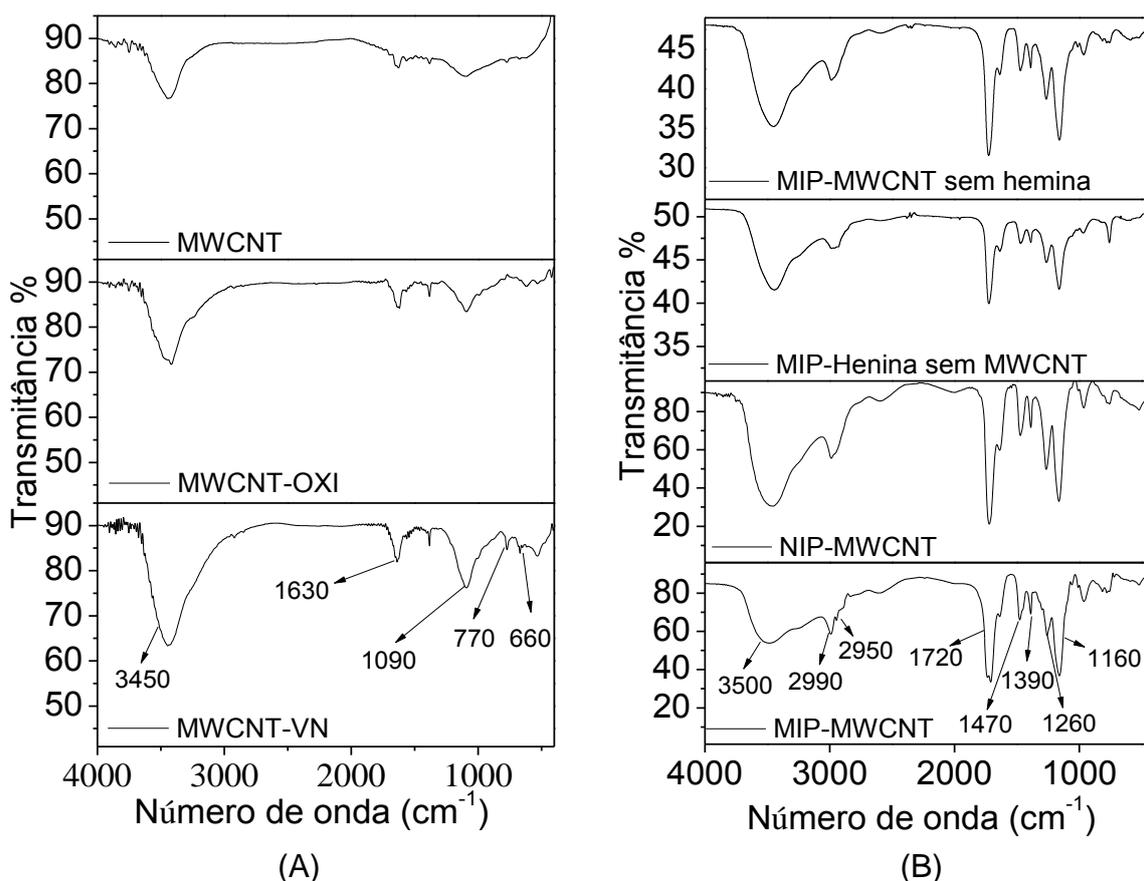
Para os ensaios de adição e recuperação em biodiesel as amostras foram enriquecidas com padrões de TBHQ e BHA preparados em metanol até as concentrações de $18,43 \text{ mg Kg}^{-1}$ e 40 mg Kg^{-1} , a analisadas pelo método desenvolvido e HPLC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os materiais obtidos em cada etapa da síntese foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho (Figura 16 A e B) e por análise termogravimétrica (Figura 17 e 18), com o intuito de elucidar os grupos funcionais presentes e analisar o comportamento térmico.

Figura 16 - Espectros de infravermelho dos materiais obtidos na síntese. (A) MWCNT, MWCNT-OXI e MWCNT-VN, (B) MIP-MWCNT sem hemina, MIP-Hemina sem MWCNT, NIP-MWCNT e MIP-MWCNT.



Analisando os espectros de infravermelho dos MWCNT, MWCNT-OXI e MWCNT-VN (Figura 16 A), observa-se a presença de bandas características de grupos hidroxila e carbonila em 3450 e 1630 respectivamente, bem como bandas

de estiramento C-O em 1090 cm^{-1} (GAO et al., 2009). No espectro do MWCNT-VN, observa-se bandas em 770 e 660 cm^{-1} referentes a grupos Si-O, característicos deste tipo de funcionalização (SOMERA et al., 2012), o que indica que o silício presente no VTMS ligou-se a superfície dos MWCNT (KIM et al., 2009; YANG; PU; YIN, 2005).

Os espectros do MIP-MWCNT, NIP-MWCNT, MIP-Hemina sem MWCNT e MIP-MWCNT sem hemina (Figura 16 B), apresentaram-se muito semelhantes entre si, devido à similaridade das matrizes poliméricas. Observa-se que os MWCNT e a hemina não interferem significativamente nos espectros apresentados, pois suas proporções na síntese são muito menores que os outros reagentes utilizados. A partir da análise dos materiais, verifica-se a presença de banda larga em 3470 cm^{-1} (SARTORI et al., 2011), que são referentes ao estiramento de hidroxila (O-H) presente nas estruturas do ácido metacrílico e da hemina. Esta banda também pode ser atribuída à água adsorvida. As bandas em 2950 e 2990 cm^{-1} , correspondem ao estiramento simétrico e assimétrico C-H de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ possivelmente formados na cadeia polimérica e presentes na estrutura da hemina (SANTOS et al., 2009; SARTORI et al., 2011). Também foram observadas bandas em 1470 e 1390 cm^{-1} características de formação angular C-H de grupo metil (OLIVEIRA et al., 2013). Em 1720 cm^{-1} é observada banda característica de carbonila presente na estrutura do MAA, TRIM e Hemina. A banda em 1630 cm^{-1} pode estar relacionada à deformação de OH de água adsorvida ou, ainda, a grupos vinílicos ainda presentes no material. Em 1160 cm^{-1} e 1260 cm^{-1} , verifica-se banda correspondente ao estiramento de ligação C-O (OLIVEIRA et al., 2013), possivelmente formadas na síntese.

Pela análise termogravimétrica em atmosfera de N_2 avaliou-se o comportamento térmico dos materiais (Figura 17 e 18). Os MWCNT, MWCNT-OXI e MWCNT-VN apresentaram comportamento térmico semelhantes, sem eventos de perda de massa significativa, permitindo afirmar que a estrutura dos MWCNT foi pouco alterada nesta etapa da síntese (MUTHU; RAJASHABALA; KANNAN, 2015; SHANMUGHARAJ et al., 2007). Adicionalmente, considerando que a quantidade massa residual na temperatura de $900\text{ }^\circ\text{C}$ foi de cerca de 15% para o MWCNT e MWCNT-OXI, enquanto que para o MWCNT-VN essa massa foi de 18%, pode-se inferir que a quantidade de VN enxertado foi de cerca 3% da massa total do material funcionalizado, o que indica que a reação do organossilano na superfície dos

MWCNT ocorreu como o esperado, em detrimento da reação de polimerização do viniltrimetoxissilano, evitando a formação de matriz inorgânica. (KIM et al., 2009).

Figura 17 - Termogramas dos materiais obtidos em cada etapa de síntese. Curva TG.

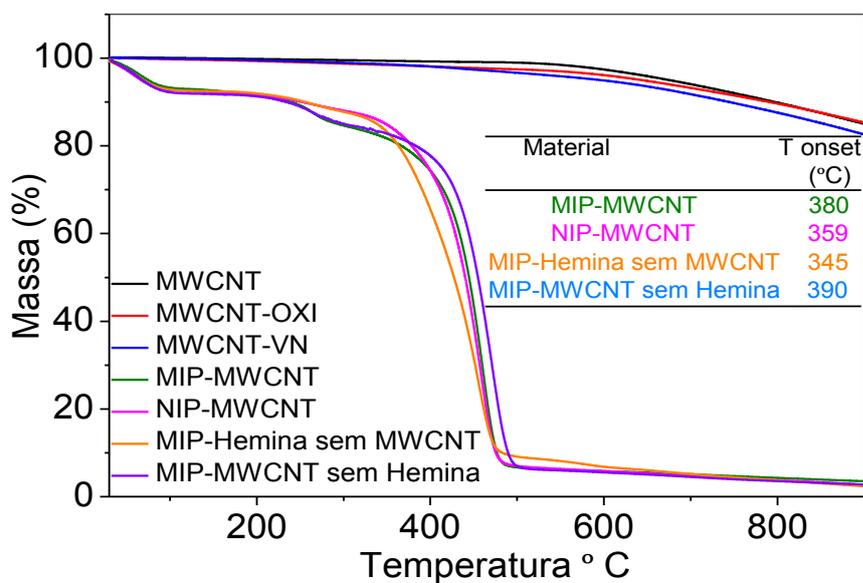
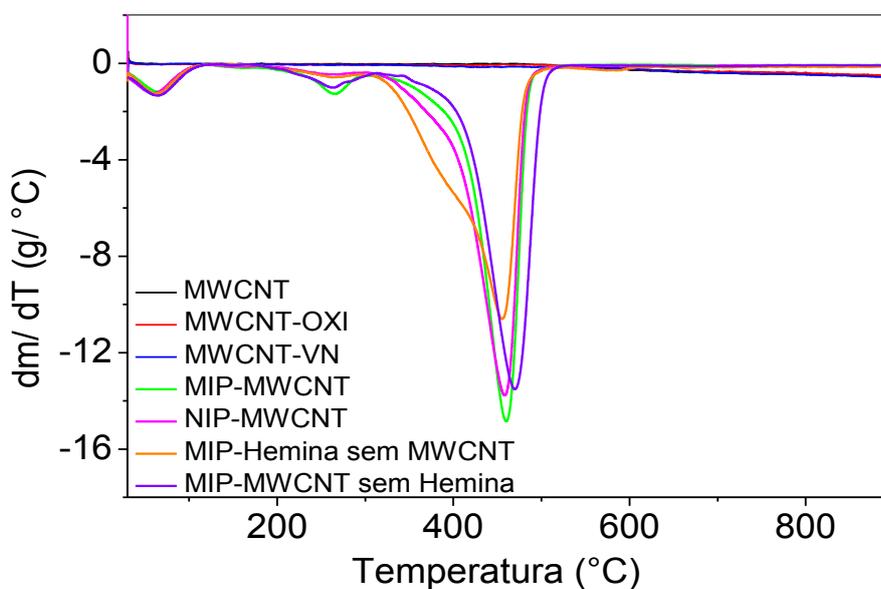


Figura 18 - Termogramas dos materiais obtidos em cada etapa de síntese. Curva DTG.



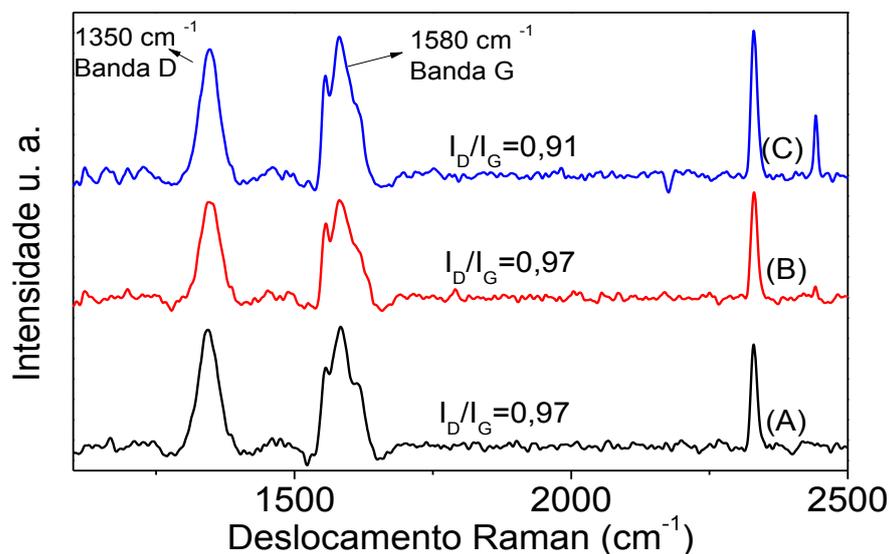
Para o MIP-MWCNT, NIP-MWCNT e o MIP-MWCNT sem hemina, observam-se três eventos de perda de massa semelhantes (Figura 18). Na temperatura de 65,6 °C, há perda de água fisicamente adsorvida, com porcentagens de perdas semelhantes 7,6, 7,4 e 7,9 %, respectivamente. No segundo evento em aproximadamente 270 °C, a perda de massa é atribuída à desidratação dos grupos carboxílicos presentes na estrutura de polímeros de ácido metacrílico, com valores de 8,6, 8,4 e 4,2 %, respectivamente para MIP-MWCNT, MIP-MWCNT sem hemina e NIP-MWCNT. O último evento em aproximadamente 460 °C, que corresponde à decomposição térmica dos segmentos de cadeia de dos resíduos de MAA e TRIM (CLAUSEN; PIRES; TARLEY, 2014), há perda de massa de aproximadamente 77,2 % para o MIP-MWCNT e 81,58% para o NIP-MWCNT. Para o MIP-MWCNT sem hemina este evento ocorreu numa temperatura um pouco maior (470 °C) com uma perda de massa de semelhante ao MIP-MWCNT (77,2 %). É importante mencionar que a decomposição térmica dos resíduos de MAA ocorre 360°C, ao passo que, para o TRIM a temperatura é próxima de 470°C (FONSECA et al., 2015). Assim, para os materiais MIP-MWCNT, MIP-MWCNT sem hemina e NIP-MWCNT não foi possível observar com clareza a separação destes eventos, muito provavelmente devido à formação de ligações poliméricas entre MAA e TRIM durante a síntese.

Para MIP sem MWCNT, observou-se comportamento semelhante aos materiais supracitados para o primeiro e segundo evento com perdas de massa de 7,3 % e 4,9 %, respectivamente. No entanto, verificou-se um terceiro evento com perda de 28% com maior velocidade de perda em aproximadamente em 370 ° C e um quarto evento em 460 °C com perda 52,5 % da massa inicial. A existência destes dois eventos para o MIP-Hemina sem MWCNT em comparação aos demais materiais contendo MWCNT, evidencia que na ausência da matriz carbonácea, os monômeros MAA exibem maior tendência de reagirem entre si. Da mesma forma, o agente de ligação cruzada TRIM exhibe tendência de reagir entre si na ausência de MWCNT. Verifica-se ainda, pelos cálculos de T on-set (PEREIRA, 2013) que o polímero sem MWCNT apresenta menor estabilidade térmica quando comparado aos polímeros com MWCNT, e que os nanocompósitos impressos possuem maior estabilidade térmica que o nanocompósito não impresso.

5.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Espectros Raman de materiais gráfiticos exibem bandas características denominadas D e G, onde a banda G (1500 a 1600 cm^{-1}) é atribuída a ligações sp^2 (grafite) presente no material e a banda D (1200 a 1400 cm^{-1}) refere-se a defeitos (desordem), na estrutura do material e formação de ligações sp^3 . A relação entre as duas bandas pode ser associada a modificações ocasionadas no material (FERRARI; ROBERTSON, 2000). No espectro Raman representado na Figura 19, observa-se as bandas D em 1350 cm^{-1} e a banda G em 1580 cm^{-1} . A razão entre elas permanece a mesma ($I_D/I_G=0,97$) para o MWCNT e o MWCNT-OXI. Entretanto, observa-se diminuição da razão ($I_D/I_G=0,91$) para o MWCNT-VN, o que mostra que houve uma pequena diminuição da desordem na estrutura gráfitica do MWCNT- VN em relação ao MWCNT e MWCNT-OXI (SHANMUGHARAJ et al., 2007). A banda observada em 2350 cm^{-1} refere-se a N_2 molecular presente no ar atmosférico (PIMENTA et al., 2007). A banda em 2450 cm^{-1} pode ser relacionada a estruturas gráfiticas de maior ordenação (SHIMADA et al., 2005).

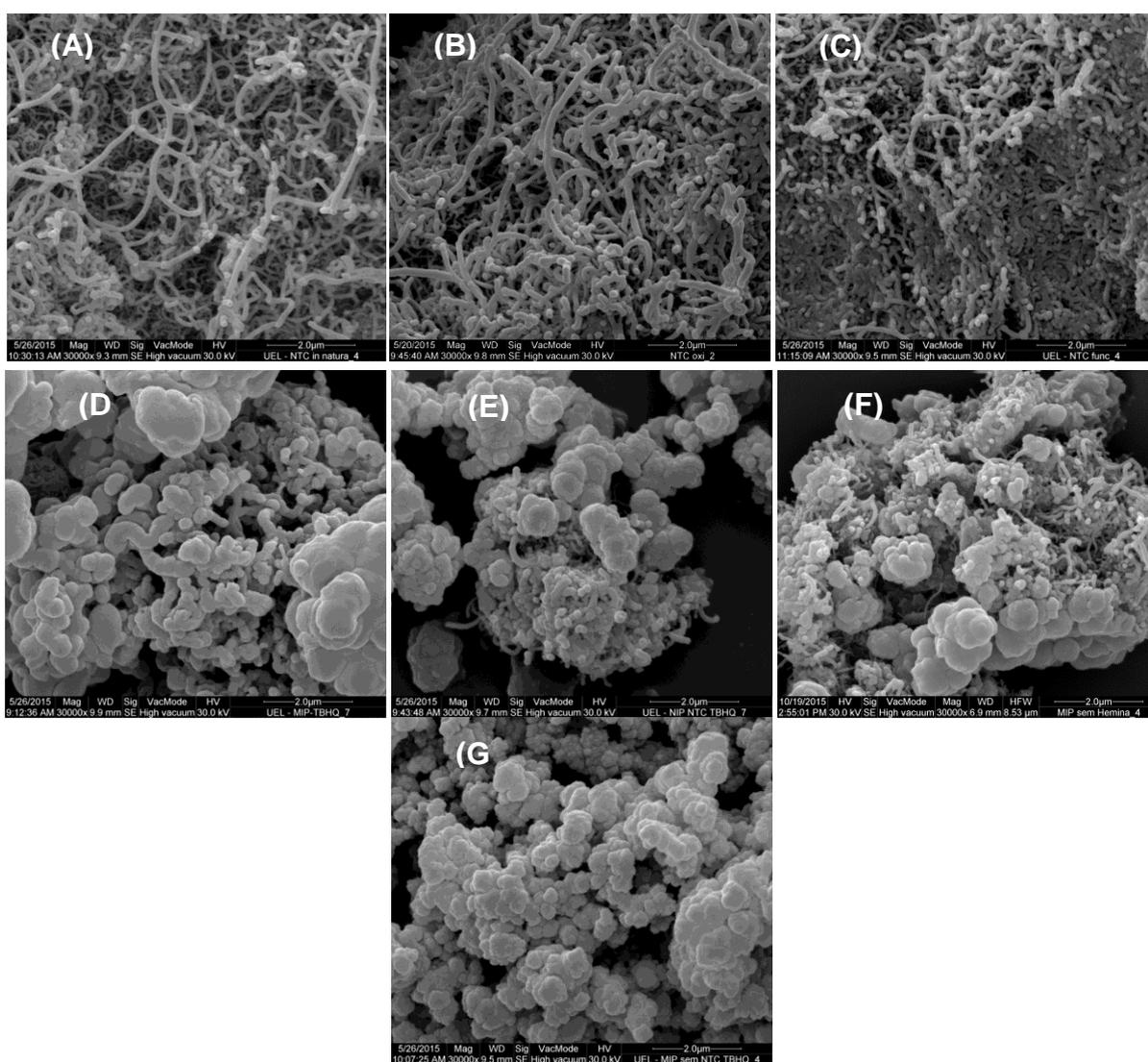
Figura 19 - Espectro de Raman de (A) MWCNT, (B) MWCNT-OXI e (C)MWCNT-VN.



5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

As estruturas morfológicas dos materiais obtidos em cada etapa da síntese foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 20).

Figura 20 - Micrografias eletrônica de varredura, com aumento de 30000 vezes, do (A) MWCNT, (B) MWCNT-OXI, (C)MWCNT-VN, (D)MIP-MWCNT, (E) NIP-MWCNT, (F) MIP-MWCNT sem hemina e (G) MIP-Hemina sem MWCNT.

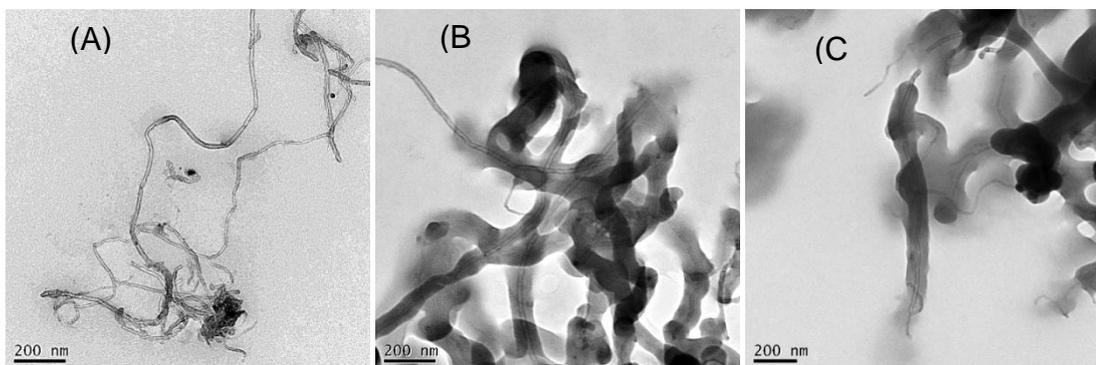


As micrografias eletrônicas de varredura exibem que os MWCNT (Figura 20 A) encontram-se emaranhados entre si, com estruturas alongadas, entretanto não apresentam a compactação observada nos MWCNT- OXI e MWCNT-

VN. O menor estado de agregação observado no MWCNT está relacionado à ocorrência de interações intermoleculares hidrofóbicas (π - π) na sua estrutura, menos intensas que as ligações de hidrogênio observadas nos MWCNT-OXI (Figura 20 B) que provém dos grupos hidroxila, carbonila e carboxila, gerados após o processo de oxidação. Nos MWCNT-VN (Figura 20 C), o maior grau de agregação pode ocorrer devido ligação entre os grupos trimetóxi do VTMS (CORAZZA, 2014). Observa-se nas micrografias do MIP-MWCNT (Figura 20 D), NIP-MWCNT (Figura 20 E) e o MIP-MWCNT sem hemina (Figura 20 F) que a matriz polimérica foi incorporada na superfície dos MWCNT. Esta constatação é mais bem observada no caso do MIP-MWCNT, onde se observa claramente o maior diâmetro do MWCNT em face da polimerização do MIP, quando comparado com o MWCNT sem modificação (Figura 20 A). Para o MIP-Hemina sem MWCNT (Figura 20 G), nota-se apenas agregados de partículas poliméricas sem a presença de filamentos de MWCNT.

Para confirmar se a polimerização realmente ocorre na superfície dos MWCNT, foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 21). A Figura 21 A mostra a imagem de MET para o material MWCNT-VN, onde se observa que a morfologia do MWCNT é preservada após a funcionalização com VTMS, indicando que reações de hidrólise e condensação (processo sol-gel) na etapa de funcionalização não ocorrem. Na etapa de funcionalização com VTMS, espera-se que o grupo silano seja ancorado na superfície do MWCNT e, por consequência, o grupo vinílico fique disponível para participar da reação de polimerização radicalar do MIP (KIM et al., 2009). Nas micrografias eletrônicas de transmissão do MIP-MWCNT e NIP-MWCNT (Figura 21 B e C) observa-se que as estruturas dos MWCNT foram preservadas, sendo estes recobertos por uma camada nanométrica do polímero, indicando o sucesso da síntese proposta.

Figura 21 - Micrografias eletrônica de transmissão do (A) MWCNT-VN, (B) MIP-MWCNT e (C) NIP-MWCNT.



Os dados texturais do MIP-MWCNT, NIP-MWCNT, MIP-Hemina sem MWCNT e MIP-MWCNT sem hemina são reunidos na Tabela 1. Constata-se que os polímeros MIP-MWCNT e MIP-MWCNT sem hemina apresentam área superficial menor que a do NIP-MWCNT. Isto está relacionado ao fato de que a presença da molécula molde no meio reacional pode aumentar a interação do complexo monômero-templete com o solvente porogênico, e contribui para a formação de poros com menor volume e, conseqüentemente, materiais com área superficial menor (MATA et al., 2014). No entanto, o MIP-Hemina sem MWCNT apresentou área superficial maior que o MIP-MWCNT, deste modo, supõe-se que na ausência dos MWCNT, o solvente porogênico apresenta menor interação com a cadeia polimérica no decorrer da síntese. Esta suposição faz sentido ao se considerar que os MWCNT possuem elevada dispersibilidade no solvente porogênico (tolueno) e, portanto, sua presença no meio reacional pode diminuir a área superficial do nanocompósito.

Tabela 1- Área de superfície, volume de poros e tamanhos de poros.

Material	Área superficial (m ² g ⁻¹)	Volume de poro (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro de poro (nm)
MIP-MWCNT	2,7	0,011	3,40
NIP-MWCNT	12,1	0,024	3,06
MIP-Hemina sem MWCNT	11,3	0,044	3,40
MIP-MWCNT sem hemina	3,9	0,019	3,09

O MIP-MWCNT, NIP-MWCNT, MIP-Hemina sem MWCNT e MIP-MWCNT sem hemina apresentaram diâmetros de poro de aproximadamente 3 nm, sendo classificados como mesoporosos (CORMACK; ELORZA, 2004).

5.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM MIP-MWCNT COMO SENSOR BIOMIMÉTICO DE PEROXIDASE

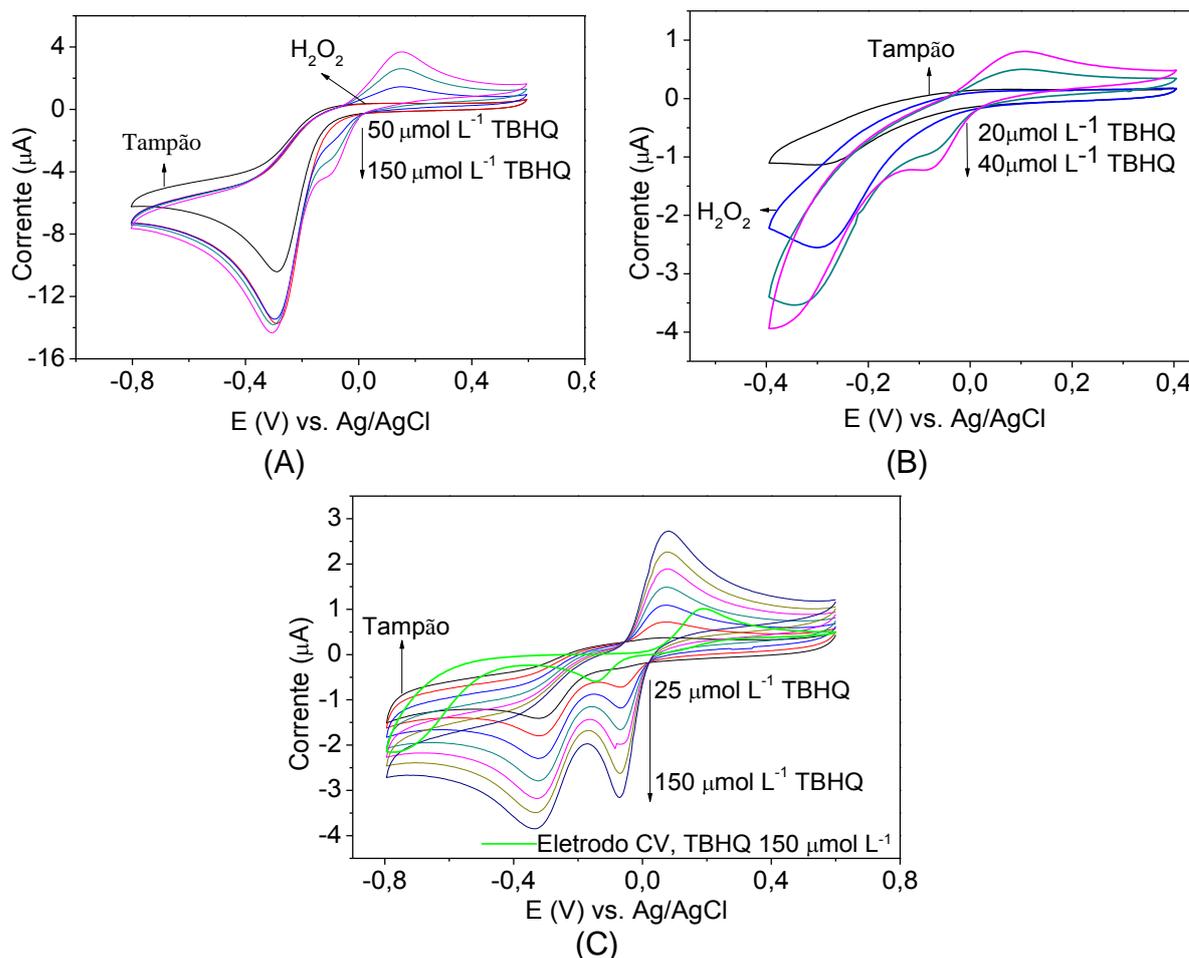
Medidas voltamétricas foram realizadas com o eletrodo modificado com MIP-MWCNT frente à determinação de TBHQ na presença de H_2O_2 com o intuito de avaliar se o sensor atua mimetizando o mecanismo da enzima peroxidase, e se o composto fenólico atua como mediador de elétrons (Figura 22). O mecanismo de transferência mediada de elétrons sugere que o composto fenólico sofra oxidação pelo sítio ativo (oxidado), reduzindo o ferro da hemina para sua forma férrica, produzindo elétrons que são direcionados à superfície do transdutor pelo sítio ativo da hemina (ROSATTO et al., 2001; RUZGAS et al., 1995; RUZGAS et al., 1996). Neste estudo também foi avaliada a influência do O_2 no meio analítico.

Na Figura 22 A, observa-se um pico catódico em -0,3V referente à redução de Fe(III) para Fe(II) (branco analítico) (LIU et al., 2012 ; YIN et al., 2009), porém, sobreposto devido a redução catalítica de O_2 dissolvido no meio para H_2O . Ao adicionar H_2O_2 há um aumento na corrente de redução em -0,3 V indicando, como esperado, que o sítio da hemina catalisa a redução de H_2O_2 , mediante a oxidação do Fe(III), presente no sítio ativo da hemina, para um composto intermediário (Fe IV=O,R+). Entretanto, ao adicionar TBHQ não foi observado aumento significativo nesta corrente de pico. Nota-se que os picos de oxidação (0,15 V) e redução (-0,09 V) do TBHQ ocorrem independentes a redução do H_2O_2 , indicando que o composto fenólico não atua como mediador de elétrons no processo catalítico de redução de H_2O_2 pela hemina (ROSATTO et al., 2001; RUZGAS et al., 1995; RUZGAS et al., 1996).

A Figura 22 B mostra que após borbulhar N_2 por 10 minutos na célula eletroquímica o pico de redução catalítica de O_2 diminui. Com a adição de H_2O_2 é observado mesmo comportamento da Figura 22 A, ou seja, há aumento da corrente em -0,30 V devido à redução catalítica de H_2O_2 pela hemina. Após adição de $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ, constata-se aumento na corrente de redução em -0,30 V, indicando, neste caso, um possível efeito mediador do composto fenólico na redução

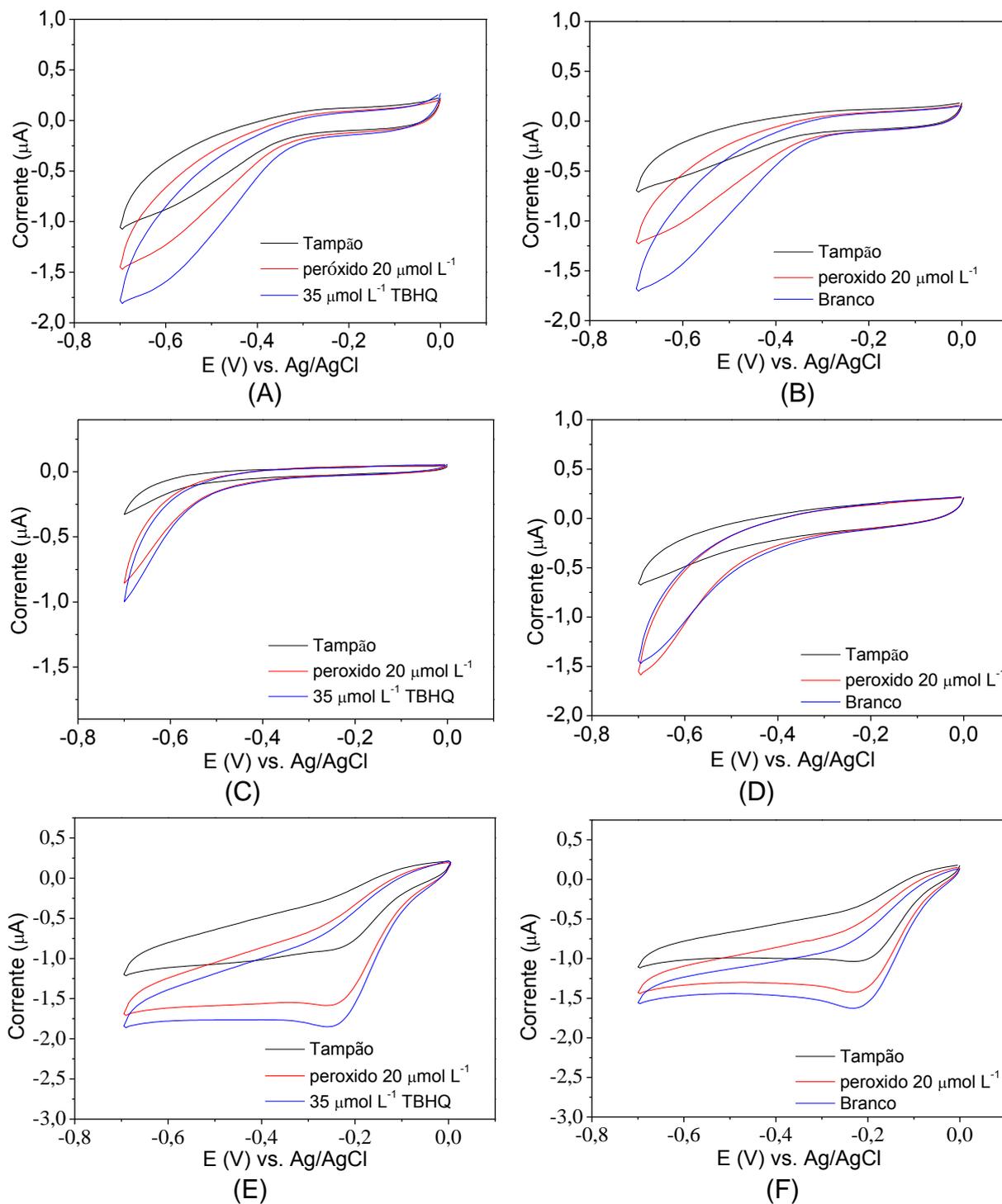
catalítica de H_2O_2 pela hemina. Entretanto, como os picos de oxidação e redução em 0,15 e -0,09 V, respectivamente, da TBHQ continuaram ocorrendo independentes a redução do H_2O_2 , sugere-se que o ganho de corrente após a adição de TBHQ é devido ao oxigênio dissolvido proveniente da agitação antes de cada medida. Para confirmar esta constatação, experimentos foram realizados na ausência de H_2O_2 e O_2 , porém após cada adição de TBHQ à célula eletroquímica, a solução foi agitada por 10 segundos para homogeneizar a solução. Verificou-se em -0,35 V incrementos de corrente de redução após a adição de TBHQ, mas, como esperado, este aumento de corrente é devido a concentrações crescentes de O_2 no meio causada pela agitação (Figura 22 C), pois nota-se também um aumento nas correntes de oxidação (0,15 V) e redução (-0,09 V) do TBHQ.

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos obtidos para TBHQ na presença de H_2O_2 e O_2 (A), presença de H_2O_2 e ausência O_2 (B) e ausência de H_2O_2 e O_2 (C). Condições: Eletrólito Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), 30 mV s^{-1} , 2º ciclo.



Considerando que o processo de redução e oxidação do TBHQ ocorre de forma independente da presença do H_2O_2 em ampla faixa de potencial de -0,8 a 0,6 V, optou-se por avaliar com maiores detalhes o comportamento voltamétrico do TBHQ em região catódica (0,0 até -0,7 V) na ausência de O_2 . Para tanto, o comportamento voltamétrico do TBHQ na presença de $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , bem como de brancos analíticos nos eletrodos CV, CV-MWCNT e CV-MIP-MWCNT foram comparados com o intuito de confirmar que os sinais de redução obtidos -0,35 V são, de fato, ao oxigênio dissolvido após a agitação da solução e não ao efeito mediador o TBHQ (Figura 23). Os voltamogramas apresentados na Figura 23 A (na presença de TBHQ) e 23 B (na ausência de TBHQ) para CV são semelhantes e exibem sinal de redução próximo de -0,60 V, atribuído à redução de O_2 no meio. Resultados similares foram obtidos para o sensor CV-MWCNT (Figuras 23 C e D). Em relação ao sensor de CV-MIP-MWCNT, observa-se, mediante adição de H_2O_2 aumento de corrente de redução em potencial bastante inferior (-0,23V) quando comparado aos sensores CV e CV-MWCNT, indicando um processo de redução catalítica para H_2O_2 . No entanto, incrementos similares de corrente de redução foram notados após a adição de TBHQ e branco analítico, revelando mais uma vez que o sinal é referente presença de oxigênio dissolvido no sistema, devido à agitação e não ao efeito mediador do TBHQ. Assim sendo, considerando que o sensor não apresenta propriedades biomiméticas similares à peroxidase frente à determinação de compostos fenólicos na presença de H_2O_2 , optou-se por realizar medidas voltamétricas na ausência de H_2O_2 e em regiões anódicas.

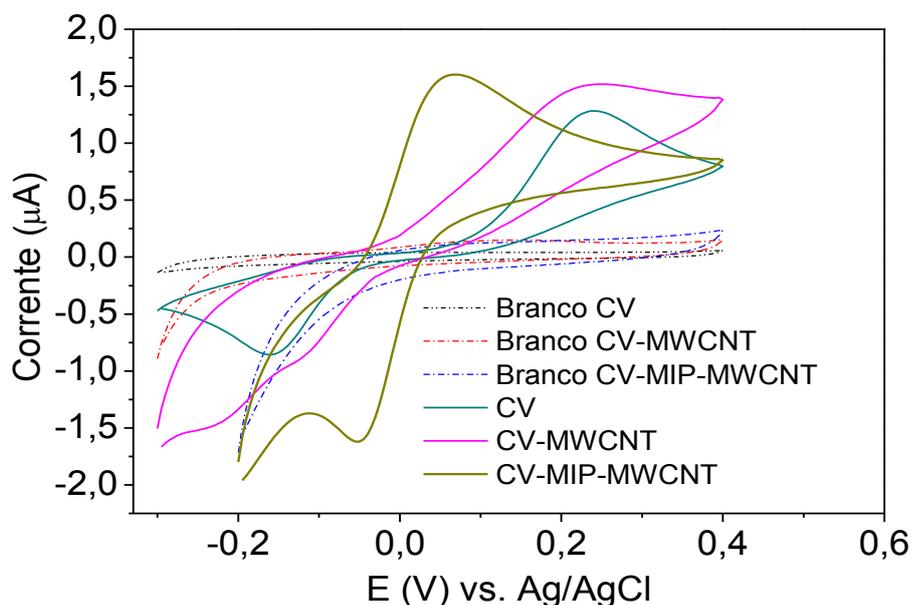
Figura 23 – Comparação do comportamento voltamétrico catódico de TBHQ ($35 \mu\text{mol L}^{-1}$) e branco, com eletrodos de CV (A) e (B), CV-MWCNT (C) e (D), CV-MIP-MWCNT (E) e (F). Por voltametria cíclica. Condições: Eletrólito Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), 30 mV s^{-1} , 2º ciclo.



5.5 COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DE TBHQ UTILIZANDO ELETRODOS DE CV, CV-MWCNT E CV- MIP-MWCNT NA AUSÊNCIA DE H₂O₂

Neste estudo, o comportamento voltamétrico do TBHQ no sensor CV- MIP-MWCNT foi comparado com os eletrodos de CV e CV-MWCNT (Figura 24). Os experimentos foram realizados por voltametria cíclica na ausência de O₂ e H₂O₂ efetuando as medidas na região de -0,3 a 0,4 V. De acordo com o perfil voltamétrico obtido no eletrodo CV-MIP-MWCNT observa-se, em comparação aos eletrodos CV e CV-MWCTN, incrementos de corrente e deslocamento dos potenciais de oxidação e redução do TBHQ para valores próximos de 0,0 V, evidenciando maior reversibilidade na eletro-oxidação e maior detectabilidade.

Figura 24 - Voltamogramas cíclicos de TBHQ (100 μmol L⁻¹) na ausência de oxigênio em eletrodos de CV, CV-MWCNT, CV-MIP-MWCNT.: Eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0), 30 mV s⁻¹, 2º ciclo.

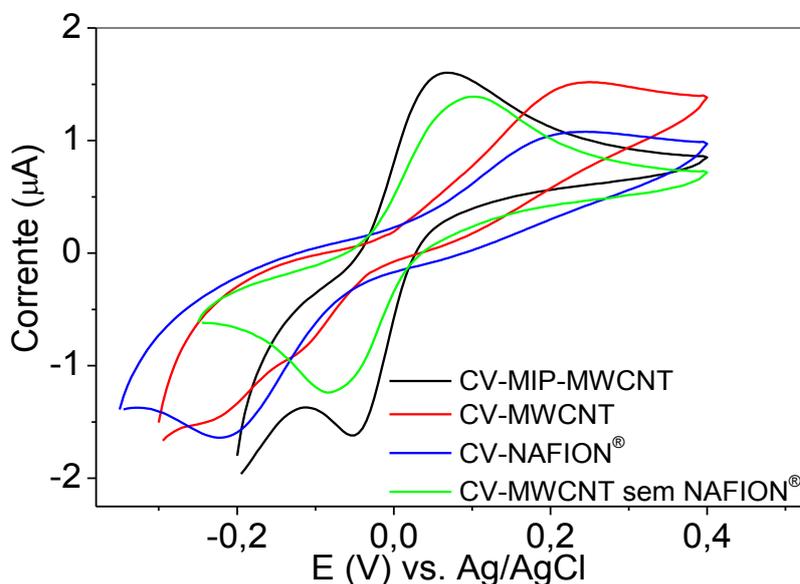


Ainda sobre a Figura 24, observa-se, para o sensor CV-MWCNT maior separação dos picos de oxidação e redução da TBHQ, quando comparado ao com eletrodo de carbono vítreo sem modificação. Este resultado é um tanto quanto inesperado, já que os MWCNT tem a capacidade de melhorar a taxa transferência de elétrons na superfície do sensor (FERREIRA; RANGEL, 2009; HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004; DUARTE; KUBOTA; TARLEY, 2012). Este

comportamento observado pode ser atribuído à camada de NAFION[®] utilizada para fixar os materiais à superfície do eletrodo.

Assim sendo, a fim de avaliar a influência NAFION[®] no comportamento voltamétrico supracitado, o eletrodo de carbono vítreo foi modificado somente com MWCNT (CV-MWCNT sem NAFION[®]), e com 7 μL de NAFION[®] 1,6 % (CV-NAFION[®]). Verifica-se na Figura 25, que o CV-NAFION[®] exibiu resultados muito próximos aos observados com o CV-MWCNT. Já nas medidas efetuadas com o CV-MWCNT sem NAFION[®] nota-se que os picos de oxidação e redução de TBHQ, apresentaram melhor definição em relação aos registrados com o CV-MWCNT, e com correntes próximas às observadas para o sensor CV-MIP-MWCNT, porém vale ressaltar que o sensor desenvolvido também sofreu a influência do NAFION[®], o que comprova seu melhor desempenho frente aos sensores avaliados.

Figura 25 - Voltamogramas cíclicos de TBHQ ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) na ausência de oxigênio em eletrodos de CV-MIP-MWCNT, CV-MWCNT, CV- NAFION[®] e CV-MWCNT sem NAFION[®]: Eletrólito Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), 30 mV s^{-1} , 2^o ciclo.

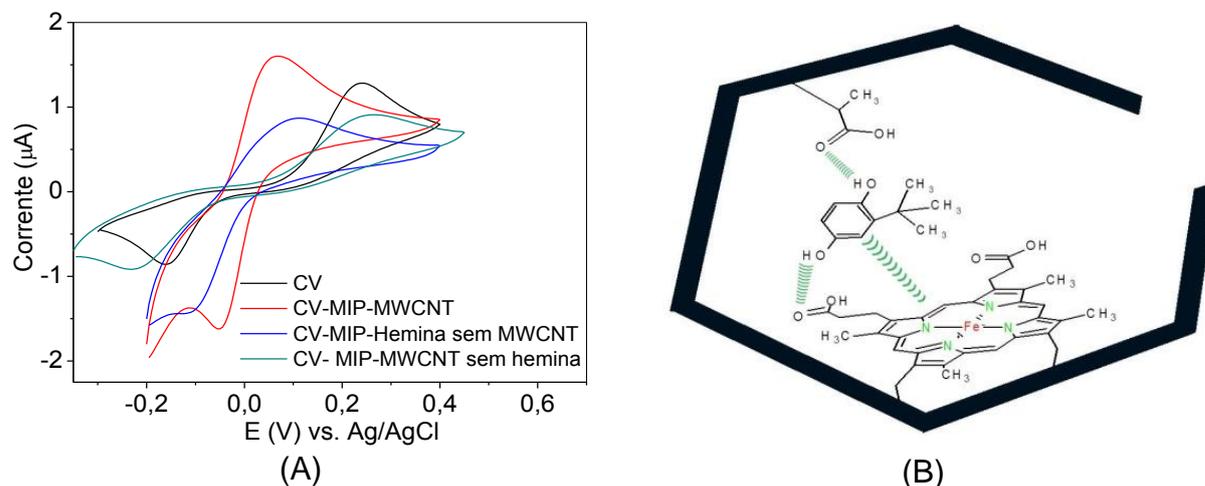


Para avaliar a influência da hemina e MWCNT no comportamento voltamétrico do sensor CV-MIP-MWCNT frente à eletro-oxidação do TBHQ, foram sintetizados os seguintes materiais, a saber: MIP na ausência de MWCNT e presença de hemina (MIP-Hemina sem MWCNT) e MIP na presença de MWCNT e ausência de hemina (MIP-MWCNT sem hemina). Após a síntese destes materiais e

preparo dos eletrodos, voltamogramas de TBHQ em CV, CV-MIP-MWCNT, CV-MIP-Hemina sem MWCNT e CV-MIP-MWCNT sem hemina foram comparados (Figura 26 A).

Comparando os voltamogramas obtidos no eletrodo de CV e CV-MIP-MWCNT sem hemina, observa-se que os potenciais de redução e oxidação do TBHQ são similares, porém, as correntes de pico para o CV foram superiores. Este resultado pode ser explicado pela menor área eletroativa do CV-MIP-MWCNT sem hemina em comparação ao CV, conforme será posteriormente apresentado (Tabela 2). Para o sensor CV-MIP-Hemina sem MWCNT constatou-se, em comparação ao eletrodo de CV, deslocamentos pronunciados dos picos de oxidação e redução do TBHQ para próximo de 0,0 V, evidenciando os efeitos de interação da hemina (ZHANG et al., 2013). O sensor CV-MIP-MWCNT exibe, em relação aos demais sensores, além de maior reversibilidade na eletro-oxidação do TBHQ, com potenciais de oxidação e redução próximos de 0,0 V, maiores correntes de pico, indicando o efeito sinérgico entre a hemina e MWCNT. A Figura 26 B apresenta uma representação esquemática da interação do TBHQ nos sítios formados no polímero. Podem ocorrer interações π - π entre os anéis presentes na molécula de TBHQ e na estrutura da protoporfirina de ferro, e ligações de hidrogênio entre as hidroxilas do composto fenólico e os grupos carboxílicos provenientes do MAA e hemina. O incremento na corrente pode estar ligado a efeitos sinérgicos entre capacidade de transferência de elétrons dos MWCNT (FERREIRA; RANGEL, 2009; HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004) e as interações da TBHQ com a hemina (ZHANG et al., 2013).

Figura 26 – (A) Voltamogramas cíclicos de TBHQ (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em eletrodos de CV, CV-MIP-MWCNT, CV-MIP-Hemina sem MWCNT e CV-MIP-MWCNT sem hemina. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0), 30 mV s^{-1} , 2° ciclo e sem oxigênio e (B) Possíveis interações entre TBHQ e o MIP-MWCNT.



Buscando complementar a elucidação para o aumento de corrente observado para o CV-MIP-MWCNT, foram calculadas as áreas eletroativas dos eletrodos. Essas áreas, foram calculadas por meio da equação de Randles-Sevcik (2) SKOOG et al, 2006).

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A c D^{1/2} v^{1/2} \quad (2)$$

Na equação, I_p é a corrente (catódica ou anódica), A é a área eletroativa do eletrodo (cm^2), n o número de elétrons, c é a concentração (mol cm^{-3}) da molécula sonda ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$), v é a velocidade de varredura utilizada no experimento (V s^{-1}) e D é o coeficiente difusional. Neste experimento, com a solução padrão de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} em KCl 1 mol L^{-1} , as medidas foram realizadas por voltametria cíclica com velocidades de varredura de 10 a 100 mVs^{-1} para definir os coeficientes angulares de I_p vs $v^{1/2}$. Sabendo que a molécula sonda foi o $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, com $n=1$ e $D=7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, foi possível estimar as áreas eletroativas dos eletrodos (Tabela 2).

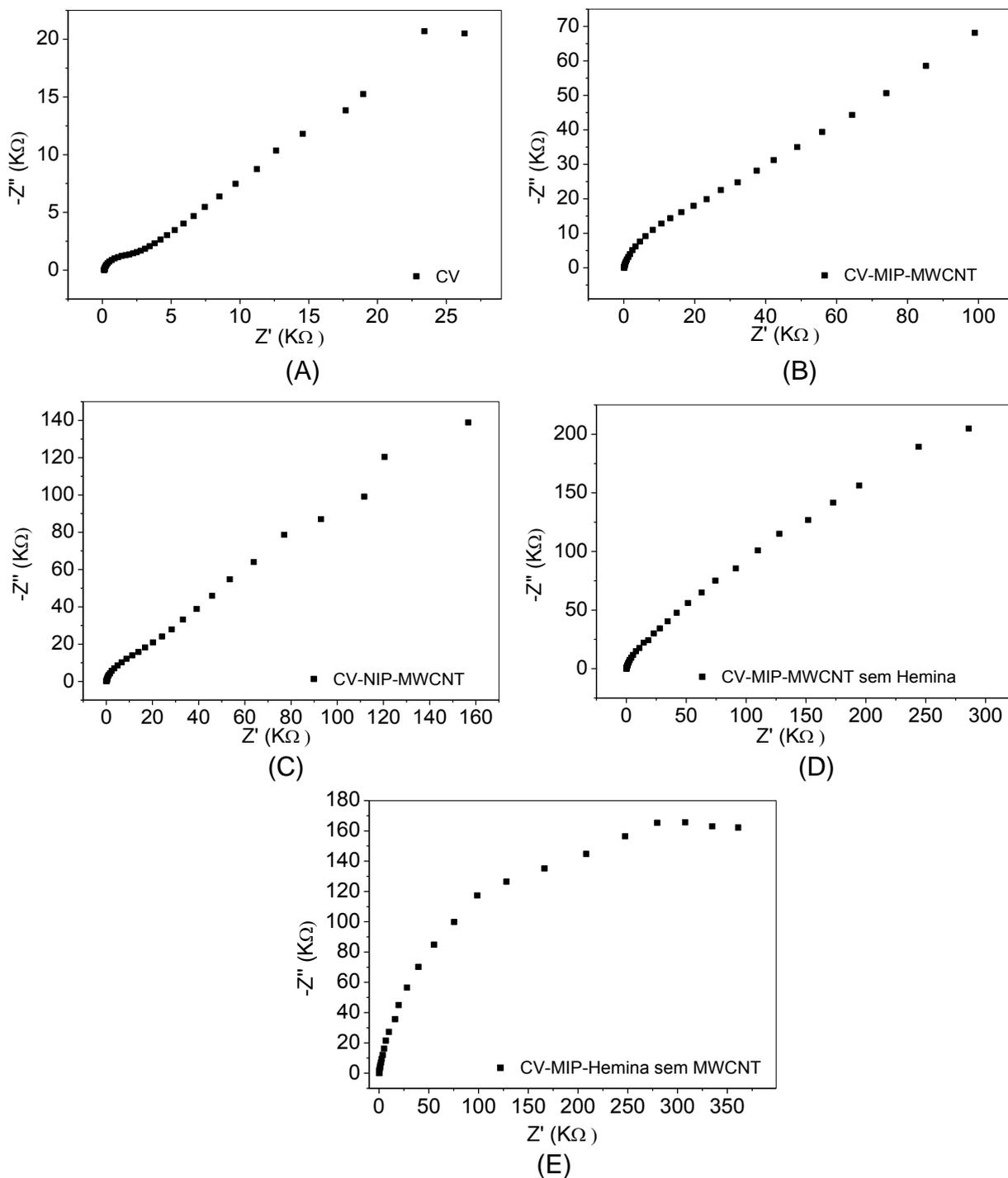
Tabela 2- Área eletroativa dos eletrodos.

Eletrodo	Área Eletroativa (cm ²)
CV	0,014
CV-MIP-MWCNT	0,00275
CV-MWCNT	0,00284
CV-NIP-MWCNT	0,0108
CV-MIP-Hemina sem MWCNT	0,00129
CV-MIP-MWCNT sem hemina	0,00678

Os eletrodos CV-MIP-MWCNT, CV-MWCNT e o CV-MIP-Hemina sem MWCNT apresentaram área eletroativa muito menor que o eletrodo de carbono vítreo sem modificação, mostrando que o aumento de corrente para o TBHQ no eletrodo CV-MIP-MWCNT não tem relação ao aumento de área eletroativa (CLAUSEN, 2014), mas, de fato, ao efeito sinérgico do MWCNT e hemina (ZHANG et al., 2013). Estes resultados também confirmam o desempenho voltamétrico do TBHQ em CV e CV-MIP-MWCNT sem hemina (Figura 26 A), na qual as maiores correntes para o CV se deve ao efeito de área.

A Espectroscopia de impedância Eletroquímica foi utilizada para avaliar a capacidade de transferência de elétrons na superfície dos sensores desenvolvidos. As medidas foram realizadas em solução de $K_3Fe(CN)_6$ 1.0 mmol L⁻¹ com KCl 0.1 mol L⁻¹, fixando o potencial de pico anódico para cada eletrodo, variando a frequência de 100 kHz a 10 mHz. Observa-se nos Diagramas de Niquist representados na Figura 27, que para o eletrodo de carbono vítreo verifica-se um pequeno semicírculo na região de altas frequências, o que indica uma baixa resistência à transferência de elétrons em relação aos outros sensores aqui preparados (MEDEIROS; ROCHA-FILHO; FATIBELLO-FILHO, 2010). Os sensores CV-MIP-MWCNT, CV-NIP-MWCNT e o CV-MIP-MWCNT sem hemina apresentaram em altas frequências, semicírculos com diâmetros inferiores quando comparados com o CV-MIP-Hemina sem MWCNT, ou seja, a presença dos MWCNT diminui a resistência à transferência de carga dos nanocompósitos, o que comprova a boa condutividade dos MWCNT (FERREIRA; RANGEL, 2009; HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004). Verifica-se nos Diagramas de Niquist que os sensores CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT apresentaram resultados próximos aos observados para o eletrodo de carbono vítreo sem modificação, o que evidencia o efeito sinérgico entre a hemina e MWCNT na redução da resistência a transferência de elétrons na superfície dos sensores.

Figura 27 – Diagramas de Niquist de: (A) CV; (B) CV-MIP-MWCNT; (C) CV-NIP-MWCNT; (D) CV-MIP-MWCNT sem hemina e (E) CV-MIP-Hemina sem MWCNT

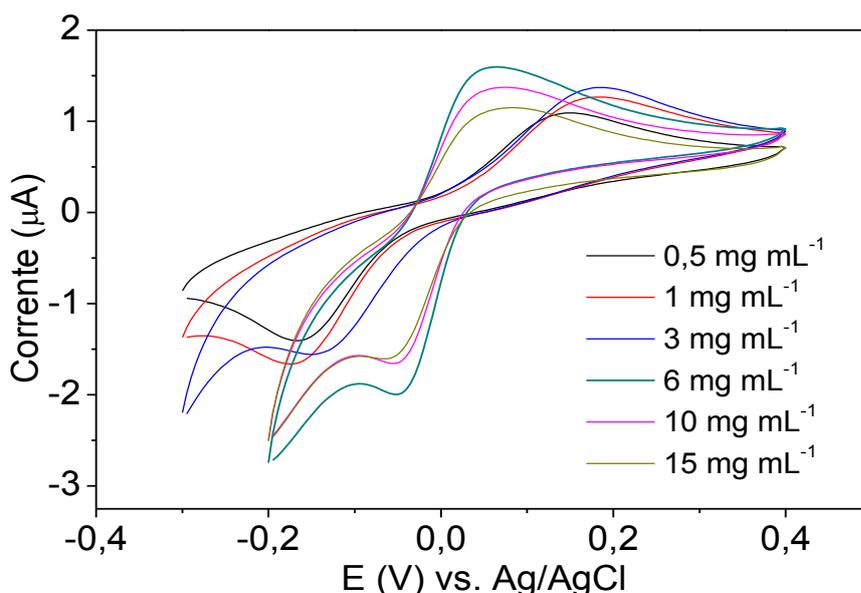


5.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUSPENSÃO E PH, NA OXIDAÇÃO DE TBHQ.

Importantes fatores, tais como, concentração de suspensão de MIP-MWCNT, pH foram investigados no sentido de obter as melhores condições para determinação de TBHQ no sensor CV-MIP-MWCNT.

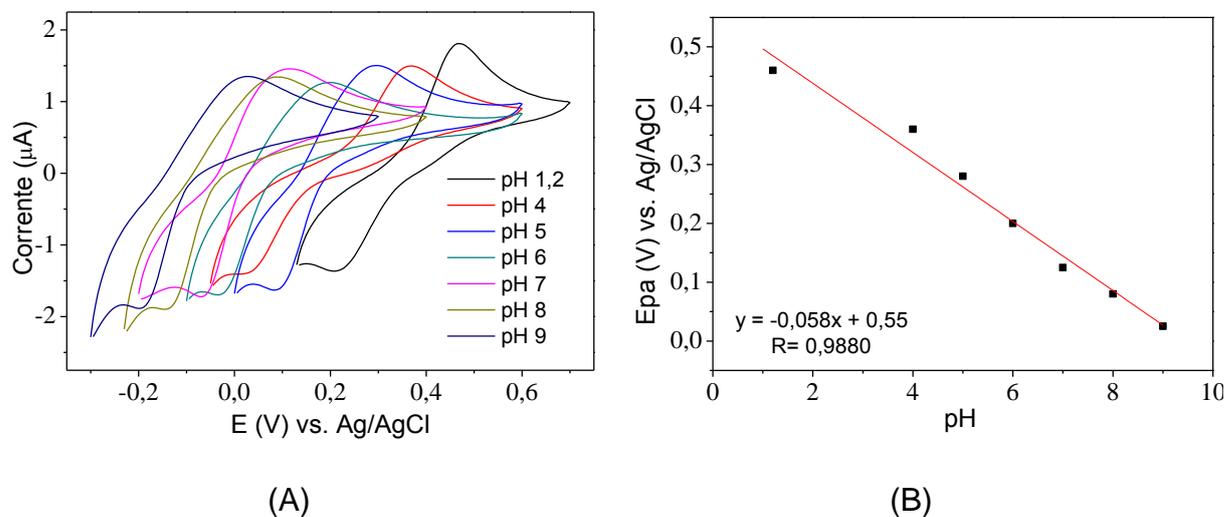
De acordo com a Figura 28 observa-se, para concentrações maiores de suspensão (6,0 a 15,0 mg L⁻¹), menores valores de ΔE_p ($E_{pa}-E_{pc}$), ao passo que, para concentrações menores (0,5 a 3,0 mg L⁻¹), os valores de ΔE_p foram superiores. Em menores concentrações a quantidade de nanocompósito não é suficiente para promover o deslocamento de potencial observado nos estudos anteriores. A melhor resposta voltamétrica foi observada para a concentração de 6,0 mg mL⁻¹. Para concentrações acima deste valor (10,0 e 15,0 mg L⁻¹), observa-se diminuição da corrente provavelmente devido ao bloqueio do fluxo de elétrons pelo excesso de material. Portanto, a concentração de 6,0 mg mL⁻¹ foi fixada para os estudos posteriores.

Figura 28- Otimização da concentração da suspensão. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0), 30 mV s⁻¹, 2º ciclo e sem oxigênio.



Para avaliar a influência do pH na eletro-oxidação de TBHQ, foi utilizado o tampão Britton-Robinson (BR) na concentração de 0,05 mol L⁻¹ numa faixa de pH de 4 à 9. Também foram realizadas medidas em meio ácido utilizando como eletrólito H₂SO₄ na mesma concentração (pH ≈ 1,2) (Figura 29).

Figura 29 - (A) Estudo de pH na faixa de 4 à 9 com tampão BR $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 1,2 com ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$; (B) Dependência do pH com Epa (V).



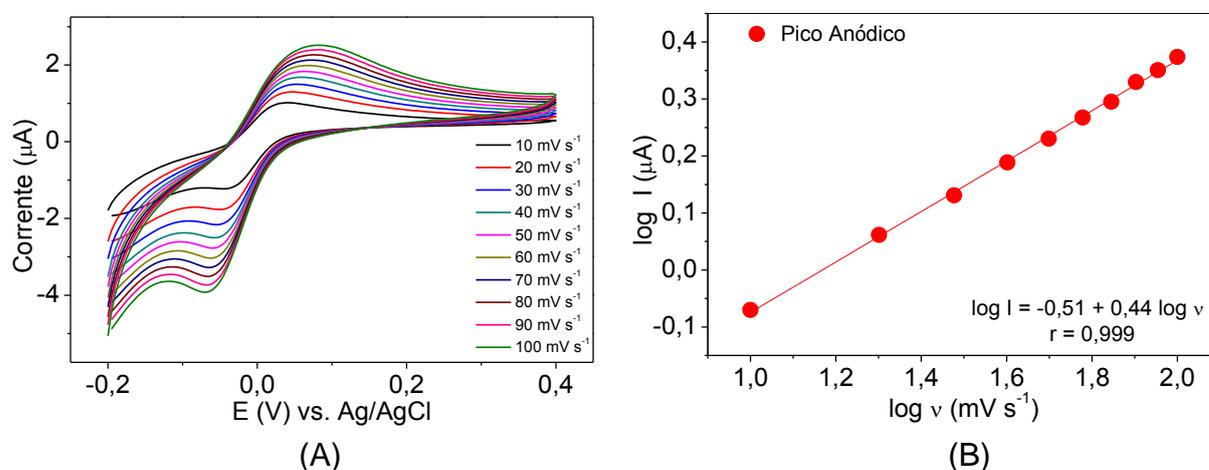
Como pode ser observado na Figura 29 A, não houve aumento significativo na corrente de pico anódico na faixa de pH estudada, o que pode confirmar que a interação da TBHQ com o sensor ocorre por meio de interações intermoleculares, como o proposto na Figura 26, uma vez que nessa faixa de pH a molécula de TBHQ ($pK_a=10,80$) (FONSECA, 2003) apresenta-se na forma molecular (protonada). Entretanto, em ácido sulfúrico (pH 1,2) houve um pequeno aumento na corrente de pico, bem como melhor definição do pico, isso possivelmente esta relacionado ao fato do ácido sulfúrico ser um eletrólito forte, o que pode melhorar a relação entre sinal e ruído. Os resultados concernentes ao pH mostram que tanto medidas voltamétricas em pH 7,0 e pH 1,2 podem ser adotadas, mas adotou-se medidas em meio ácido para a otimização dos outros parâmetros experimentais.

A Figura 29 B mostra a dependência do potencial de pico anódico do TBHQ em função da variação do pH. Constata-se que à medida que o pH aumenta, o potencial anódico diminui, apresentando um comportamento linear com coeficiente angular de $-0,058 \text{ V pH}^{-1}$, próximo a $0,059 \text{ V pH}^{-1}$ enunciados na equação de Nernst, o que permite inferir que o número de elétrons envolvidos no processo redox é igual ao número de prótons (H^+). Para a molécula de TBHQ, no processo de eletro-oxidação são envolvidos dois elétrons e dois prótons como o relatado na literatura (CARAMIT et al. 2013).

5.7 INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA NA ELETRO-OXIDAÇÃO DE TBHQ

Com o intuito de explorar se processo de transferência de elétrons é controlado por adsorção ou difusão, foi realizada a avaliação da influência da velocidade de varredura na eletro-oxidação de TBHQ, neste caso foi utilizado o sensor CV-MIP-MWCNT como eletrodo de trabalho e Tris-HCl na concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) como eletrólito de suporte. A voltametria cíclica foi utilizada para o estudo, sendo que a velocidade de varredura variou de 10 a 100 mV s^{-1} , com incremento de potencial de 5 mV . A partir dos resultados, foi plotada a relação entre o logaritmo da corrente de pico anódico e catódico ($\log I$) pelo logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$), cujo o coeficiente angular indica o comportamento cinético do processo redox (GORLA et al., 2016). Os dados obtidos neste estudo estão expressos na Figura 30.

Figura 30 - (A) Voltamogramas de TBHQ ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Relação entre $\log I$ vs $\log v$. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

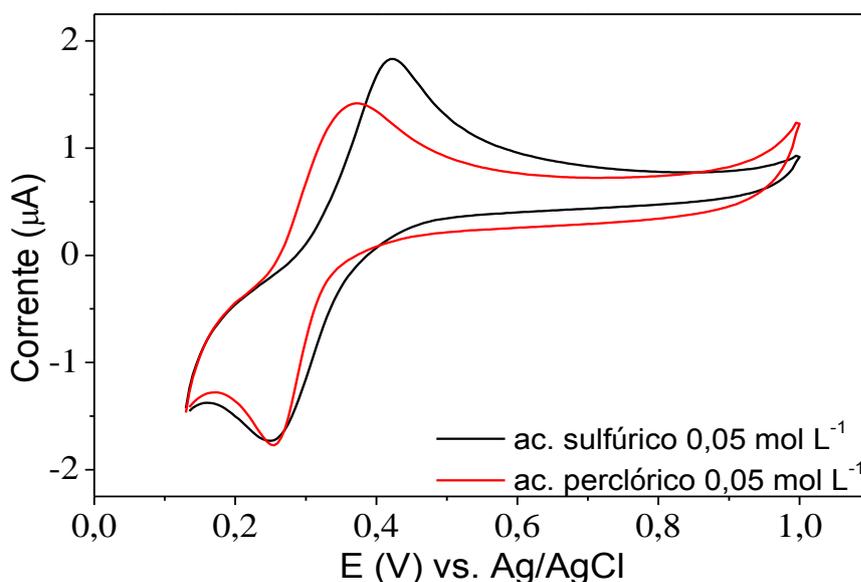


O coeficiente angular calculado a partir da relação do $\text{Log } I$ vs $\text{Log } v$ foi igual a 0,44, próximo aos 0,5 relatados na literatura para processos controlados por difusão (Du et al., 2014; GORLA et al., 2016), o que permite inferir que a etapa limitante no processo é difusão da molécula de TBHQ do seio da solução até a superfície do sensor (BARD e FAULKNER, 2000).

5.8 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO E TIPO DE ELETRÓLITO NA OXIDAÇÃO DE TBHQ

Como já mencionado, optou-se por empregar medidas em meio ácido (pH 1,2) nos estudos voltamétricos, conforme Figura 29 A. Assim, além do H_2SO_4 como eletrólito suporte, o comportamento voltamétrico do TBHQ foi também investigado utilizando ácido perclórico (HClO_4) na concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se na Figura 31 que o voltamograma cíclico obtido com o HClO_4 apresentou corrente de pico anódico inferior a obtida com o H_2SO_4 , o que pode ter relação com as propriedades oxidantes do HClO_4 , que podem danificar o filme polimérico. Assim sendo, adotou-se o H_2SO_4 como eletrólito para os estudos posteriores.

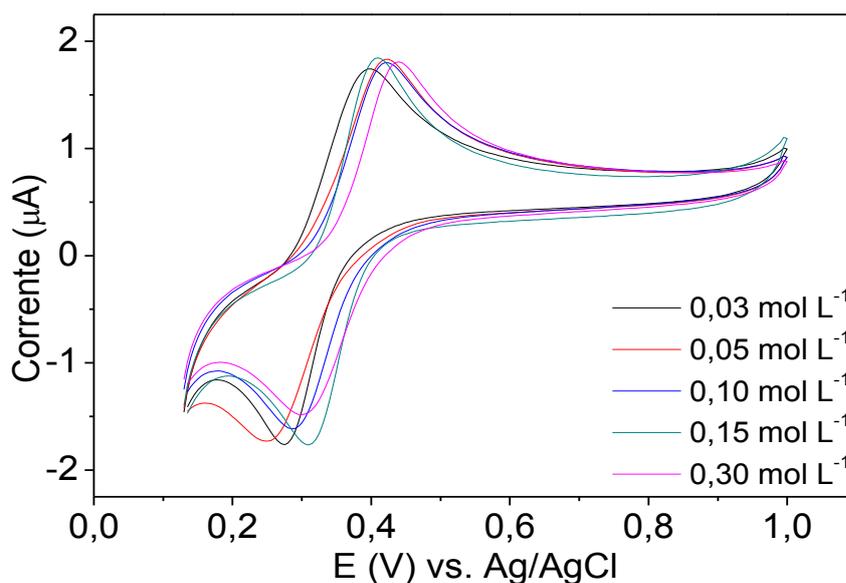
Figura 31 - Estudo de tipo de eletrólito. Condições Analíticas: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ, voltametria cíclica, com o sensor CV-MIP-MWCNT, 30 mV s^{-1} e 2º ciclo.



Para verificar a influência da concentração do eletrólito nos picos de oxidação da TBHQ foram preparadas soluções de H_2SO_4 em diferentes concentrações ($0,03$; $0,05$; $0,1$; $0,15$ e $0,3 \text{ mol L}^{-1}$). Observa-se nos voltamogramas apresentados na Figura 32 que a concentração de eletrólito não altera de forma significativa os picos anódicos do TBHQ, portanto escolheu-se $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ como concentração ótima para os estudos posteriores em virtude de sua melhor definição de pico de oxidação. Assim sendo, as condições experimentais otimizadas para

medidas voltamétricas de TBHQ foram: concentração da suspensão do MIP-MWCNT em $6,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e H_2SO_4 na concentração de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte.

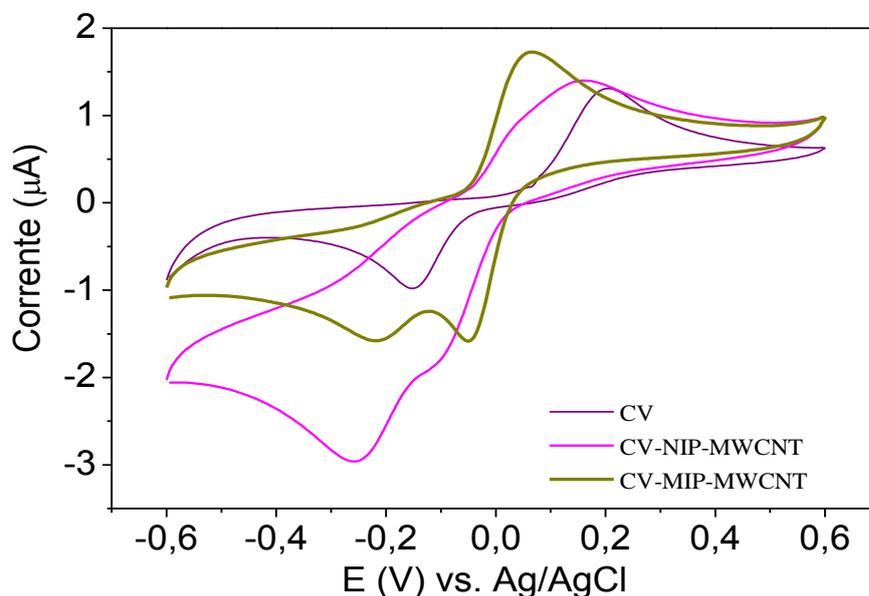
Figura 32 - Avaliação da concentração do eletrólito. Condições Analíticas: $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ, voltametria cíclica, com o sensor CV-MIP-MWCNT, 30 mV s^{-1} e 2º ciclo.



5.9 ESTUDOS DE IMPRESSÃO QUÍMICA E SELETIVIDADE

Para avaliar o efeito de impressão química do MIP-MWCNT, inicialmente foram realizadas medidas em pH 7, comparando o comportamento voltamétrico do TBHQ para os sensores CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT (Figura 33). Como esperado, maiores correntes de pico para o TBHQ e maior reversibilidade do processo de eletro-oxidação foram observadas no sensor CV-MIP-MWCNT em relação ao sensor de CV-NIP-MWCNT, indicando claramente maior afinidade da molécula de TBHQ no sensor quimicamente impresso.

Figura 33 - Voltamogramas cíclicos de TBHQ ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em eletrodos de CV, CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT: Eletrólito Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), 30 mV s^{-1} , 2º ciclo.



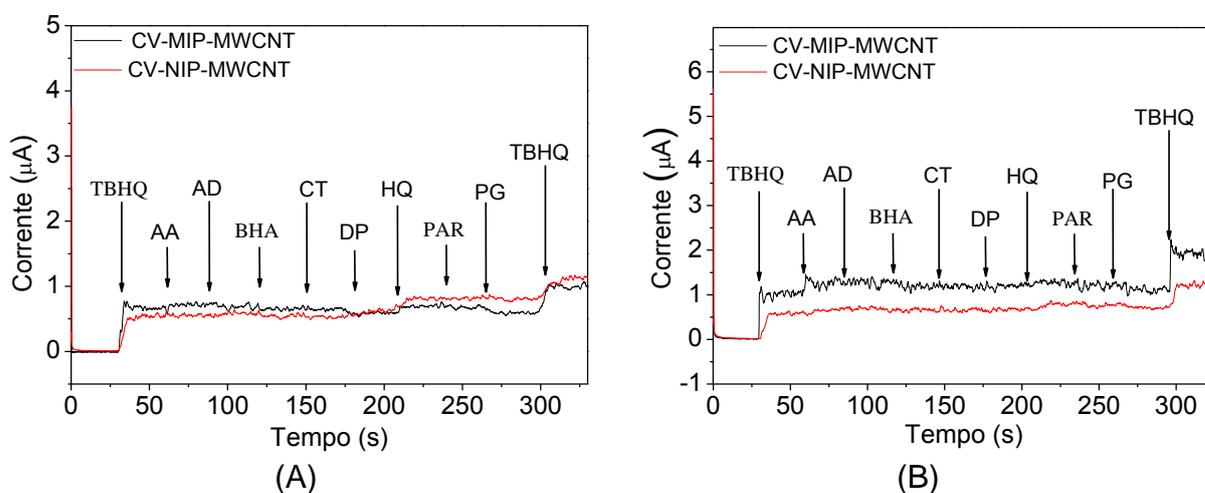
Medidas cronoamperométricas também foram realizadas com os sensores CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT frente à determinação de outras substâncias que poderiam interferir na mesma faixa de potencial do TBHQ: ácido ascórbico (AA), adrenalina (AD), butil-hidroxianisol (BHA), catecol (CT), dopamina (DP), hidroquinona (HQ), paracetamol (PAR) e propil-galato (PG), ambos na concentração de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. As medidas cronoamperométricas foram realizadas em pH 7,0 e pH 1,2 (H_2SO_4 $0,15 \text{ mol L}^{-1}$). Em pH 7,0 e para os sensores CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT os potenciais foram fixos em 0,07 V e 0,12 V, respectivamente. Em meio ácido os potenciais foram fixos em 0,42 V e 0,46 V, respectivamente, para os sensores CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT.

Quando as medidas são realizadas em pH 7,0 (Figura 34 A) verifica-se um leve ganho de corrente após a adição de TBHQ no sensor CV-MIP-MWCNT, em relação ao CV-NIP-MWCNT. Ambos os sensores não apresentaram respostas voltamétricas significativas para as substâncias potencialmente interferentes, embora o sensor CV-NIP-MWCNT tenha apresentado pequena corrente de oxidação para a hidroquinona. Após a segunda adição de TBHQ nota-se que o sensor CV-MIP-MWCNT continua respondendo ao TBHQ com aumento de corrente semelhante

à primeira adição, ao passo que para o CV-NIP-MWCNT o ganho de corrente foi menor.

Para condições ácidas (pH 1,2) (Figura 34 B), tal como ocorre em pH 7,0, ambos os sensores CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT não respondem às substâncias potencialmente interferentes, porém, observa-se claramente maiores correntes de pico para o TBHQ ao se empregar o sensor CV-MIP-MWCNT. Ainda, maiores correntes de pico para o TBHQ foram constatadas em meio ácido quando comparado as medidas em pH 7,0, corroborando os dados voltamétricos exibidos na Figura 29 A. A partir dos resultados obtidos nos estudos de impressão e seletividade, pode-se inferir que MIP-MWCNT apresenta uma maior interação com a molécula de TBHQ quando comparado com o NIP-MWCNT, muito provavelmente pela formação de sítios seletivos na síntese do MIP.

Figura 34 - Medidas cronoamperométricas de TBHQ e outras substâncias (A) em pH 7,0: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0) e (B) em condições ótimas: eletrólito H₂SO₄ 0,15 mol L⁻¹.

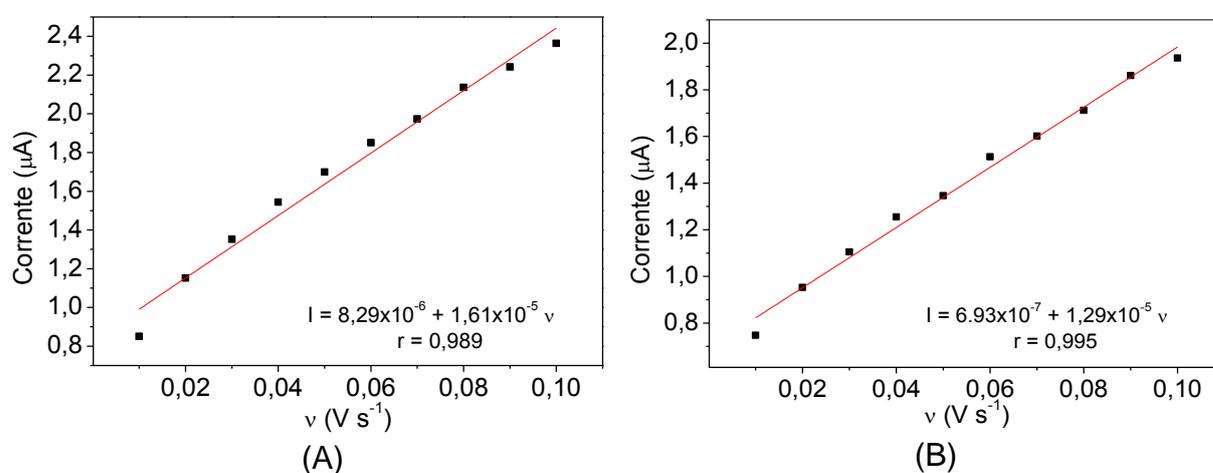


5.10 CONCENTRAÇÃO SUPERFICIAL E PARÂMETROS CINÉTICOS.

Buscando complementar os resultados obtidos nos estudos de impressão e seletividade, que mostram a forte interação entre a molécula de TBHQ e o MIP-MWCNT, foram estimadas a concentração superficial de espécies eletroativas, o coeficiente de transferência de elétrons e a constante de velocidade de transferência de carga (k_s), para os sensores CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT.

A partir dos dados obtidos no estudo da influência da velocidade de varredura na oxidação de TBHQ, foi possível calcular a concentração superficial (Γ) da espécie eletroativa (TBHQ). Para tanto, foram construídos gráficos da corrente de pico anódico (I_{pa}) pela velocidade de varredura (v) para os sensores CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT, representados na Figura 35.

Figura 35 - Gráfico de I_{pa} versus v para TBHQ ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), utilizando os sensores (A) CV-MIP-MWCNT e (B). CV-NIP-MWCNT. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).



A concentração superficial foi calculada através da equação (3), utilizando os coeficientes angulares obtidos nos gráficos apresentados na Figura 35.

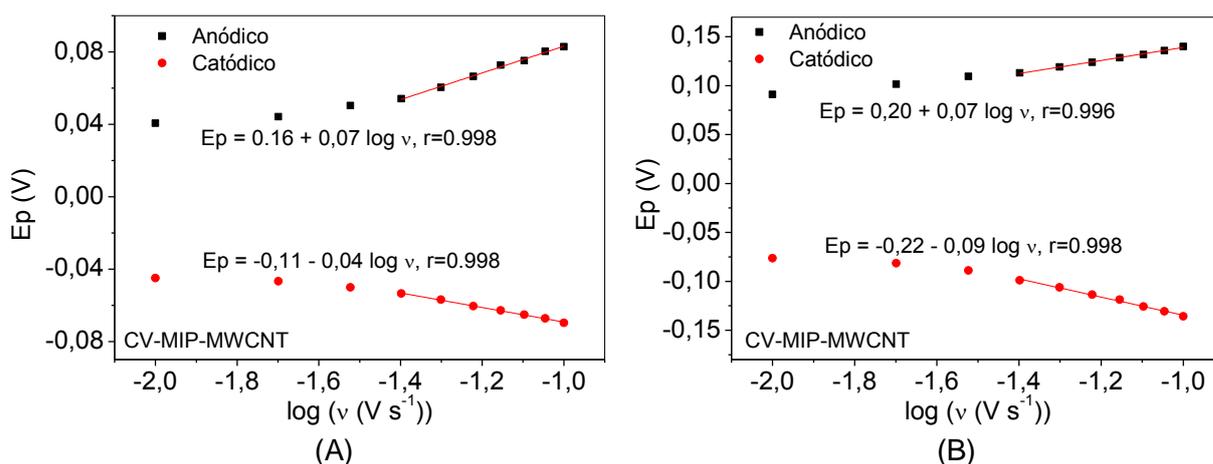
$$I_{pa} = \frac{n^2 F^2 v A_e \Gamma}{4RT} \quad (3)$$

Na equação, I_{pa} (A) é a corrente de pico anódico, n é o número de elétrons (2), F é a constante de Faraday ($96500 \text{ s A mol}^{-1}$), v é a velocidade de varredura (mV s^{-1}), A_e é a área eletroativa do eletrodo (cm^2), Γ é a concentração superficial, R é a constante dos gases ideais ($8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura (298 K) (WANG, 2000). A concentração superficial de TBHQ determinada foi de $6,23 \times 10^{-9}$ e $1,27 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, respectivamente para os sensores CV-MIP-MWCNT e CV-NIP-MWCNT, ou seja, a concentração de TBHQ na superfície do sensor CV-MIP-MWCNT no momento da medida eletroquímica é cerca de 4,91 vezes maior que

a concentração encontrada para o CV-NIP-MWCNT, o que comprova a maior interação da molécula de TBHQ com o sensor desenvolvido (HUDARI et al., 2013).

Nos experimentos anteriores observou-se que com o aumento da velocidade de varredura, houve deslocamento dos potenciais anódicos e catódicos de TBHQ para valores mais positivos e negativos, respectivamente. Em velocidades de varredura mais elevadas, verifica-se comportamento linear para a relação entre os potenciais de pico anódico e catódico (E_p) e o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$). Segundo o Modelo de Laviron, a relação E_p vs $\log v$ (Figura 36), da origem a dois segmentos lineares, cujos coeficientes angulares são iguais a $2.303RT/(1-\alpha)NF$ e $-2,303RT/\alpha NF$, para os picos anódico e catódico, respectivamente. A partir desses dados foi possível calcular o coeficiente de transferência de elétrons (α). Para o CV-MIP-MWCNT os valores de α anódico e catódico encontrados foram de 0,60 e 0,74, com um valor médio de 0,66. O CV-NIP-MWCNT apresentou valores de α anódico e catódico de 0,56 e 0,32, com um coeficiente de transferência de elétrons médio de 0,44 (GODOY et al. 2016).

Figura 36 - Gráfico de E_p vs $\log v$ para TBHQ ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), utilizando os sensores (A) CV-MIP-MWCNT e (B). CV-MIP-MWCNT. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).



Com os valores encontrados para os coeficientes de transferência de carga médios, foi possível estimar as constantes de velocidade de transferência de carga (k_s) a partir da equação de Laviron (4) (LAVIRON, 1979).

$$\text{Log}k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \frac{RT}{nFv} - \alpha nF(1 - \alpha) \frac{\Delta E_p}{2,3RT} \quad (4)$$

onde, k_s é a constante de velocidade de transferência de carga, α é a média coeficiente de transferência de elétrons anódico e catódico, v é a velocidade de varredura ($0,06 \text{ V s}^{-1}$), ΔE_p é a diferença entre os picos anódico e catódico, n é o numero de elétrons (2) envolvidos e os símbolos F , R e T foram mencionados no estudo anterior. A valor de k_s para o CV-MIP-MWCNT foi estimado em $0,229 \text{ s}^{-1}$, cerca de 8,25 vezes maior que o valor de k_s calculado para o CV-NIP-MWCNT que foi de $0,028 \text{ s}^{-1}$, que indica que o efeito sinérgico entre a impressão química, MWCNT e a hemina contribui para o aumento da taxa de transferência de elétrons no processo de oxidação de redução da molécula de TBHQ (GODOY et al., 2016; LAVIRON, 1979), dado que corrobora com os resultados obtidos nos estudos de impressão e concentração superficial, e comprovam a grande afinidade da molécula com o MIP-MWCNT.

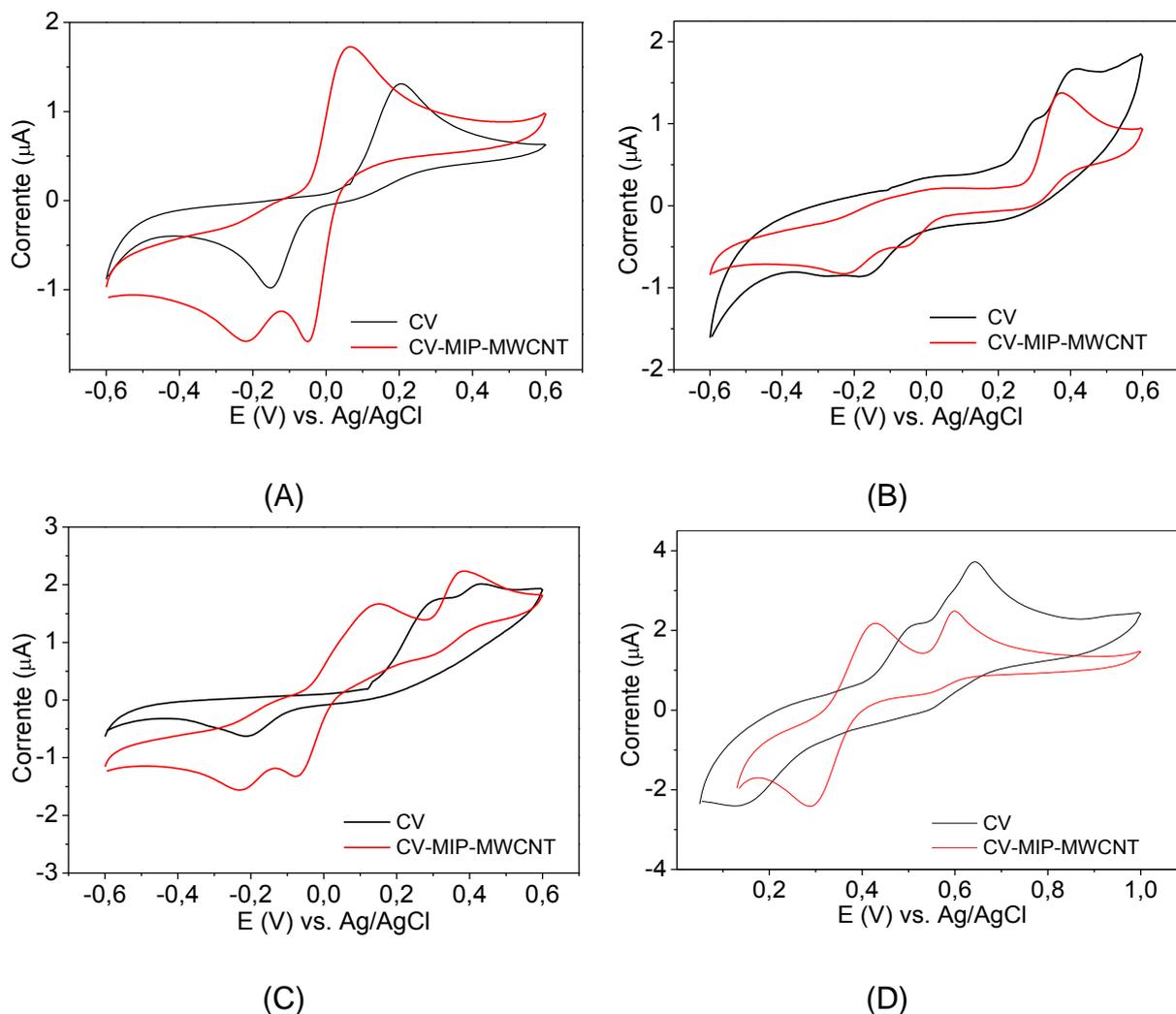
5.11 AVALIAÇÃO DO SENSOR CV-MIP-MWCNT PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TBHQ E BHA

Após os estudos de impressão química do MIP-MWCNT, analisou-se a viabilidade da determinação simultânea de TBHQ e BHA, uma vez que o BHA também pode ser encontrado em amostras lipídicas. Os estudos foram inicialmente realizados em pH 7,0, fixando a concentração dos antioxidantes em $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para tanto, previamente foi comparado o comportamento voltamétrico individual dos dois antioxidantes com o eletrodo de CV e o sensor CV-MIP-MWCNT e, posteriormente, voltamogramas da mistura binária dos antioxidantes foram registrados nos dois sensores.

Verifica-se na Figura 37 A, como já observado em estudos anteriores, que o emprego do sensor CV-MIP-MWCNT promove deslocamentos dos potenciais de oxidação e redução do TBHQ para valores mais próximos de $0,0 \text{ V}$ e um aumento significativo nas correntes de pico quando comparado com o eletrodo de CV. Nos voltamogramas cíclicos do BHA, Figura 37 B, verifica-se que, com o eletrodo de CV, o BHA apresentou pico de oxidação pouco definido além da presença de um segundo pico possivelmente referente a algum subproduto de

oxidação. Para o CV-MIP-MWCNT, houve maior definição do pico de oxidação e um leve deslocamento de potencial para valores menos positivos.

Figura 37 - Voltamogramas cíclicos em eletrodos de CV e CV-MIP-MWCNT para (A) TBHQ, (B) BHA, (C) determinação simultânea de TBHQ e BHA: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0), 30 mV s⁻¹, 2^o ciclo e (D) determinação simultânea de TBHQ e BHA nas condições ótimas: eletrólito H₂SO₄ 0,15 mol L⁻¹, 30 mV s⁻¹, 2^o ciclo.



Na determinação simultânea de TBHQ e BHA (Figura 37 C) constata-se que, para o eletrodo de CV, os picos de oxidação do TBHQ e BHA foram sobrepostos dificultando a determinação simultânea dos antioxidantes. Entretanto, para o sensor CV-MIP-MWCNT, houve a separação satisfatória dos picos de oxidação dos analitos possibilitando a determinação simultânea. O pico de redução observado em -0,23V no CV-MIP-MWCNT é referente à redução do ferro presente na hemina, já discutido em experimentos anteriores. Em condições ácidas,

(Figura 37 D), como o observado na Figura 37 C os picos dos antioxidantes foram sobrepostos na medida realizada com o eletrodo de carbono vítreo, já para o CV-MIP-MWCNT verificou-se melhor separação dos picos anódicos de TBHQ e BHA, embora em potenciais mais positivos em relação às medidas em pH 7,0. Portanto, fixou-se, para a determinação simultânea de TBHQ e BHA o H_2SO_4 0,15 mol L^{-1} , como eletrólito suporte.

5.12 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA ELETROANALÍTICA

Para explorar as melhores condições voltamétricas na determinação simultânea de TBHQ e BHA, foi realizada uma triagem previa das técnicas de voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD). Neste estudo, a técnica de VPD apresentou maiores valores de corrente de pico anódico em relação à VOQ, além de uma melhor definição de pico.

Com o intuito de obter os melhores parâmetros da técnica de VPD na oxidação de TBHQ, inicialmente, variou-se a amplitude de pulso (AP) de 40 a 160 mV, mantendo-se constantes a velocidade de varredura (VV) em 10 mV s^{-1} e o tempo de pulso (TP) em 25 ms. Verificou-se que ao elevar a AP ocorreu o aumento da corrente anódica para os dois analitos, entretanto, em AP maiores que 100 mV observou-se o alargamento do pico anódico do BHA, portanto, escolheu-se 100 mV de AP para a continuidade dos experimentos.

Na sequência foram fixados o tempo de pulso em 25 ms e a AP em 100 mV, variando a VV de 5 a 50 mV s^{-1} . Observou-se maior corrente para a VV de 5 mV s^{-1} , porém, com valores semelhantes a VV de 10 mV s^{-1} . Assim sendo, a velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} foi fixada para os próximos experimentos.

Por fim, variou-se o TP de 10 a 40 ms, mantendo constantes a AP em 100 mV e a VV em 10 mV s^{-1} . Constatou-se que a corrente de oxidação dos antioxidantes aumenta à medida que o TP diminui, entretanto, em TP menores que 25 ms ocorreu a deformação do pico de oxidação da TBHQ, conseqüentemente, este valor de TP foi escolhido para a continuidade dos estudos. Deste modo, as melhores condições da técnica de VPD, obtidos neste estudo foram 100 mV de amplitude de pulso, velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} e tempo de pulso de 25ms.

Os parâmetros avaliados na otimização da técnica de VOC estão resumidos na Tabela 3.

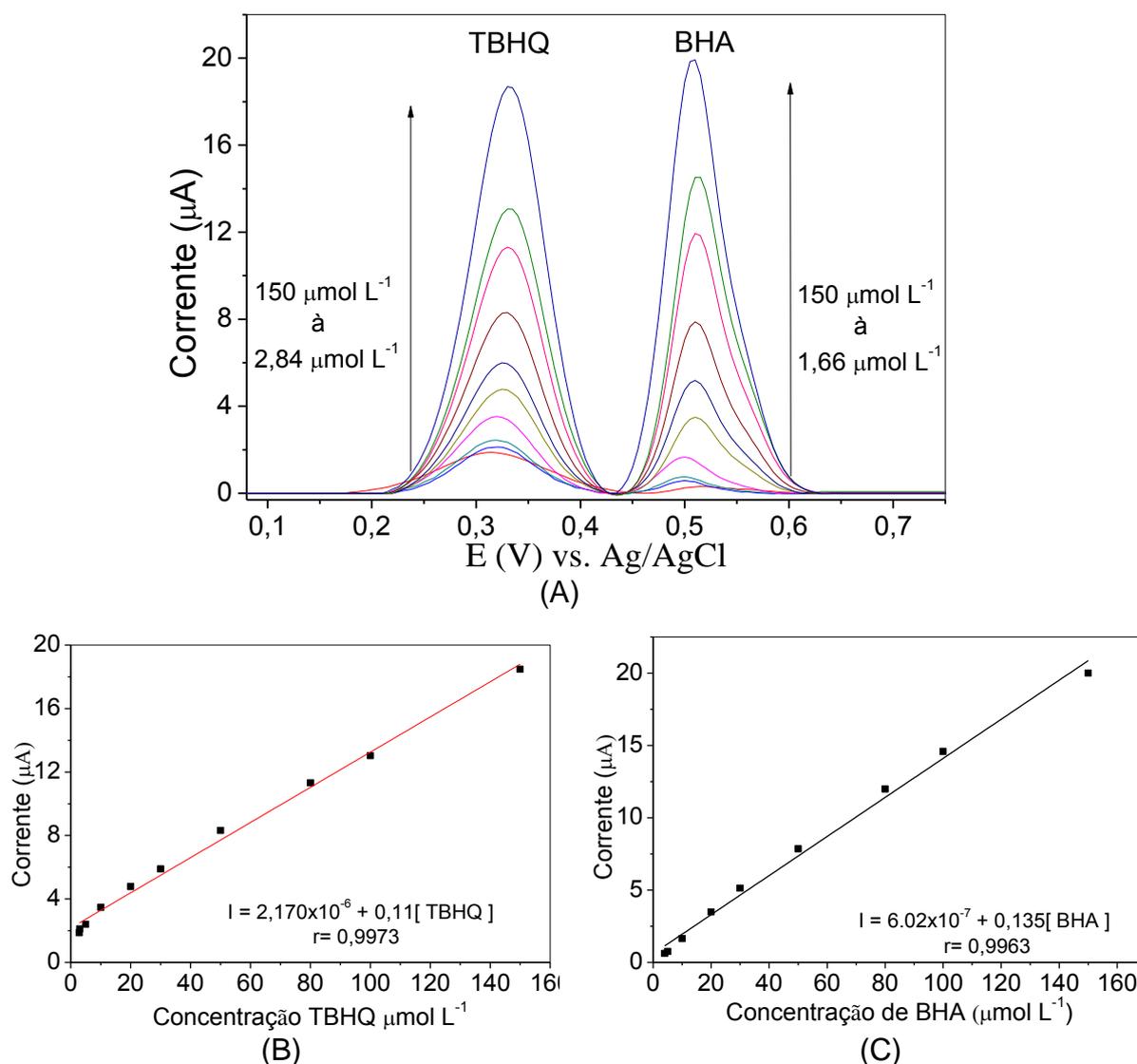
Tabela 3 - Faixa estudada valores otimizados, obtidos para a determinação simultânea de TBHQ e BHA VOC

VOC	Faixa estudada	Valores otimizados
Amplitude de pulso (mV)	(10-70)	30
Frequência (Hz)	(1-30)	25
Incremento de potencial (mV)	(1-15)	10

5.13 DESEMPENHO ANALÍTICO DO SENSOR CV-MIP-MWCNT PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TBHQ E BHA POR VPD

Os parâmetros de desempenho analítico do sensor CV-MIP-MWCNT foram obtidos sob condições otimizadas. A Figura 38 A, mostra os voltamogramas para concentrações crescentes de TBHQ (2,84 a 150,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e BHA (1,66 a 150,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Verifica-se nas Figuras 38 B e C que as curvas analíticas apresentaram equações lineares $I (\mu\text{A}) = 2,17 \times 10^{-6} + 0,111[\text{TBHQ } \mu\text{mol L}^{-1}]$, e $I(\mu\text{A}) = 6,02 \times 10^{-7} + 0,136[\text{BHA } \mu\text{mol L}^{-1}]$, com coeficientes de correlação linear satisfatórios, acima de 0,99. O limite de detecção ($\text{LD} = 3S_b/m$) e limite de quantificação ($\text{LQ} = 10S_b/m$) foram calculados, sendo S_b o desvio padrão obtido para 10 medidas do branco e m o coeficiente angular da curva analítica de acordo com as descrito pela IUPAC (LONG; WINEFORDNER, 1983). O LD e o LQ calculados foram de 0,85 e 2,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o TBHQ e de 0,50 e 1,66 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o BHA, respectivamente.

Figura 38 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial de TBHQ e BHA simultâneos; (B) Curvas analíticas de TBHQ; (C) Curva analítica de BHA. Condições Analíticas: eletrólito H_2SO_4 $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. AP= 100 mV , VV= 10 mV s^{-1} e TP= 25 ms .

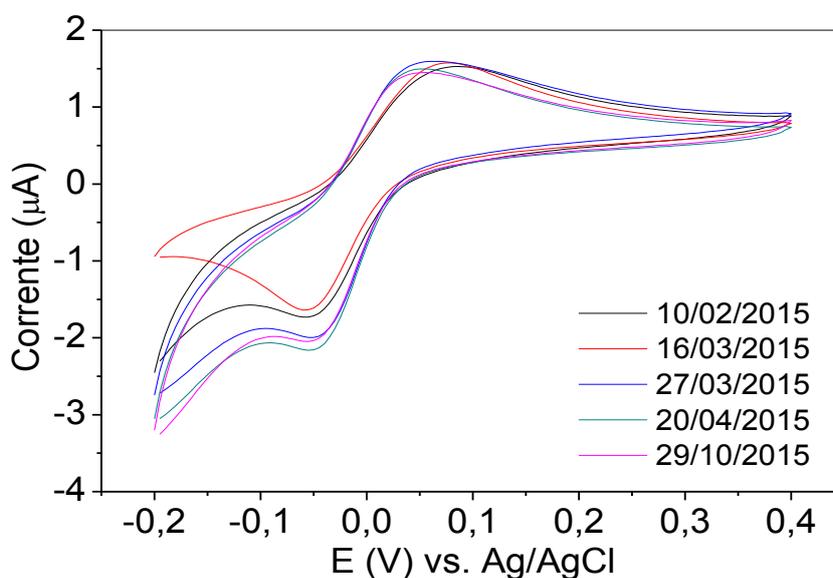


A fim de avaliar se a variação na concentração de TBHQ influencia no pico de oxidação do BHA, e vice e versa, foram realizadas medidas eletroquímicas de concentrações crescentes dos antioxidantes, mantendo um ou outro constante. Constatou-se que com o aumento das correntes de oxidação dos antioxidantes não houve a sobreposição dos picos de oxidação dos compostos, sendo que as correntes aumentaram proporcionalmente por toda a extensão da curva. A curva construída para as concentrações de $10,0$ a $150,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ, mantendo a concentração de BHA em $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentou equação linear I (μA) = $2,13 \times 10^{-6} + 0,107[\text{TBHQ } \mu\text{mol L}^{-1}]$ ($r=0,999$). Variando as concentrações de

BHA de 10,0 a 150,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com a concentração de TBHQ fixa em 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a equação linear foi descrita como $I(\mu\text{A}) = 6,02 \times 10^{-7} + 0,136[\text{BHA } \mu\text{mol L}^{-1}]$ ($r=0,999$), o que indica que não existem diferenças significativas na sensibilidade em relação as curvas analíticas reunidas na Figura 38 B,C.

A reprodutibilidade do filme na construção do sensor foi avaliada, comparando os picos anódicos de TBHQ registrados por voltametria cíclica (Figura 39) nas mesmas condições analíticas em diferentes dias (10/02/2015, 16/02/2015, 27/03/2015, 20/04/2015 e 20/10/2015). Verificou-se um desvio padrão relativo (DPR) de 3,00 % entre as medidas. Cabe ressaltar que a suspensão utilizada para o preparo do filme tem vida útil de mais de três meses, sem a necessidade de armazenamento em geladeira.

Figura 39 - Voltamogramas cíclicos de TBHQ (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes datas com o sensor CV-MIP-MWCNT. Condições Analíticas: eletrólito Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0), 30 mV s^{-1} , 2º ciclo.



A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade ($n=10$), para medidas sucessivas de TBHQ e BHA. O desvio padrão relativo encontrado para as concentrações de 30,0 e 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ foi de 2,12 % e 1,70 %, respectivamente. Para o BHA os valores foram de 1,07 % e 1,17 % respectivamente para as concentrações de 30,0 e 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A Tabela 4 mostra as figuras de mérito obtidas no método proposto em comparação com outros métodos relatados na literatura para a determinação de

TBHQ e BHA. O sensor desenvolvido apresentou desempenho satisfatório, com limites de detecção muito semelhantes aos encontrados nos estudos recentes, com a vantagem de apresentar baixo custo, estabilidade, seletividade, simplicidade, reprodutibilidade no preparo do sensor e a viabilidade de aplicação em vários tipos de amostras.

Vale ressaltar que no primeiro trabalho apresentado na Tabela 4, apesar de Ni, Wang e Kokot (2000) utilizarem o eletrodo de carbono vítreo sem modificação, fez-se necessário o uso de abordagens quimiométricas, para obter resultados satisfatórios determinação simultânea dos antioxidantes.

Tabela 4 - Comparação do método proposto com outros métodos eletroquímicos

Eletrodo	Analito	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Amostra	Referência
CV (Quimiometria)	TBHQ	6,02-90,24	0,44	Alimentos	(NI, WANG e KOKOT, 2000)
	BHA	2,78-83,22	1,05		
CV modificado AuNP	TBHQ	1,20-16,84	0,47	Óleo comestível	(LIN, NI e KOKOT 2013)
	BHA	0,55-8,32	0,22		
Eletrodo impresso de MWCNT, surfactante e deconvolução de picos	TBHQ	1-10	0,49	Biodiesel e óleo cosmético	CARAMIT et al., 2015
	BHA	1-10	0,52		
Eletrodo impresso de MWCNT e surfactante	TBHQ	0,5–10	0,34	Biodiesel	CARAMIT et al., 2013
	BHA	0,5–10	0,18		
CV modificado com AuNP e óxido de grafeno reduzido	TBHQ	0,60–42,2	0,31	Óleo comestível	(YUE et al., 2015)
	BHA	0,56–55,6	0,23		
CV modificado com MIP-MWCNT	TBHQ	3-150	0,85	Óleo de soja, maionese, margarina e biodiesel.	Este trabalho
	BHA	4-150	0,50		

* CV- carbono vítreo; MIP – polímero molecularmente impresso; MWCNT – nanotubos de carbono de multi parede; TBHQ – terc-butil hidroquinona; BHA – butil hidroxianisol; nanopartículas de ouro.

5.14 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade do método visando a determinação simultânea de TBHQ e BHA em amostras lipídicas, o método proposto foi aplicado em óleo de soja e sua exatidão comprovada por ensaios de adição e recuperação. Observa-se na Tabela 5 que foi encontrada apenas TBHQ na amostra analisada, numa concentração de $51,7 \text{ mg Kg}^{-1}$. Os percentuais de recuperação obtidos foram de 97 e 98 %, para TBHQ e BHA respectivamente, indicando que tanto o método de extração dos antioxidantes da matriz lipídica, bem a determinação simultânea dos antioxidantes são eficazes.

Tabela 5 - Ensaios de adição e recuperação de TBHQ e BHA em amostra de óleos e soja com o sensor CV-MIP-MWCNT.

Amostra	Analito	Concentração Adicionada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)
Óleo de soja	TBHQ	0	$51,7 \pm 4,5$	97
		200	$245,6 \pm 13,2$	
	BHA	0	ND	98
		200	$196,8 \pm 6,8$	

Uma vez comprovada que a matriz lipídica não exerce influência na determinação dos antioxidantes, o método desenvolvido foi aplicado em amostras de óleo de soja, margarina, maionese e biodiesel de soja, e a exatidão foi verificada comparando os resultados com os dados das análises de HPLC, utilizada como técnica de referência. As concentrações de TBHQ e BHA foram determinadas através de calibração externa, usando as curvas analíticas previamente construídas para os dois antioxidantes. Verifica-se na Tabela 6 que os resultados obtidos pelo método desenvolvido apresentaram baixos percentuais de erro em relação às análises de HPLC. O teste t pareado de *Student* foi aplicado num nível de confiança de 95 %, o que indica que não existem diferenças significativas entre os dados obtidos pelo HPLC e o métodos desenvolvido ($t_{\text{calc}} = 0,18$, inferior ao $t_{\text{tab}} = 2,23$) (NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2010).

Tabela 6 - Determinação de TBHQ e BHA em matrizes lipídicas e biodiesel, usando o método proposto (CV-MIP-MWCNT) e HPLC.

Amostra	TBHQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a		BHA ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a		Er (%) ^b	Er (%) ^b
	Sensor	HPLC	Sensor	HPLC	TBHQ	BHA
Óleo (1)	87,48 ($\pm 3,95$)	92,31 ($\pm 6,46$)	ND	ND	-5,23	
Óleo (2)	42,65 ($\pm 3,31$)	41,91 ($\pm 3,76$)	ND	ND	1,73	
Maionese (1)	105,66 ($\pm 3,45$)	112,42 ($\pm 2,45$)	26,16 ($\pm 1,17$)	28,40 ($\pm 1,40$)	-6,01	-7,89
Maionese (2)	ND	ND	83,05 ($\pm 4,25$)	79,07 ($\pm 3,73$)		5,03
Maionese (3)	ND	ND	45,91 ($\pm 1,65$)	50,89 ($\pm 0,65$)		-9,80
Margarina (1)	144,62 ($\pm 4,37$)	139,62 ($\pm 3,88$)	ND	ND	3,58	
Margarina (2)	42,31 ($\pm 2,57$)	39,50 ($\pm 0,92$)	ND	ND	7,11	
Margarina (3)	77,69 ($\pm 2,25$)	71,22 ($\pm 0,14$)	ND	ND	9,08	
Biodiesel (1)*	19,13 ($\pm 0,97$)	17,58 ($\pm 0,07$)	NA	NA	8,12	
Biodiesel (2)**	37,64 ($\pm 1,17$)	36,60 ($\pm 0,08$)	NA	NA	2,77	

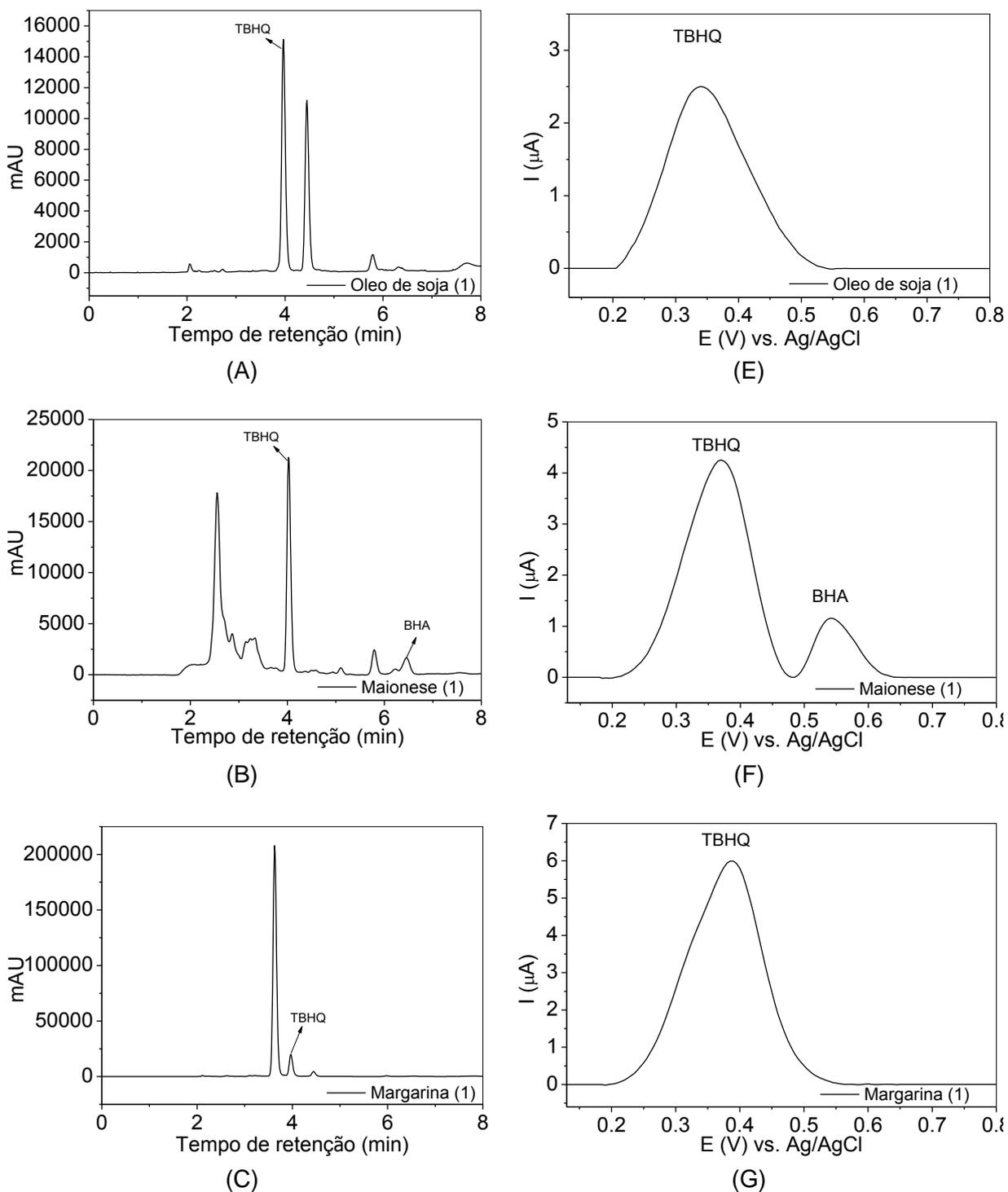
^a Resultados expressos com o valor do desvio padrão médio (\pm) em triplicata (n=3). ^b Erro(%)= $100 \times (\text{concentração sensor} - \text{concentração HPLC}) / \text{concentração HPLC}$. ND = não detectado. NA= não adicionado. *Quantidade de TBHQ adicionada no biodiesel $18,43 \mu\text{g g}^{-1}$. **Quantidade de TBHQ adicionada no biodiesel $40 \mu\text{g g}^{-1}$.

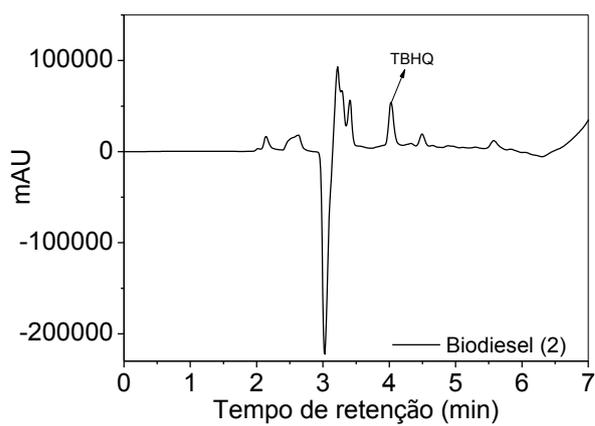
Vale ressaltar que foi detectada a presença de TBHQ em apenas uma amostra de biodiesel, quando foram realizados os testes por HPLC, porém verificou-se na aplicação que o antioxidante sofreu degradação natural. Por essa razão as amostras de biodiesel foram enriquecidas com TBHQ, uma vez que esse antioxidante é usualmente adicionado ao biodiesel nos processos industriais devido a sua maior eficácia na prevenção dos processos de auto-oxidação em relação aos outros antioxidantes sintéticos (BORSATO et al., 2012; FILHO, 2013).

O processo de degradação natural dos antioxidantes durante o armazenamento, também foi observado para as amostras de maionese, margarina e óleo de soja, já que os valores encontrados para a maioria das amostras foram muito inferiores aos $200 \mu\text{g g}^{-1}$ estabelecidos pela legislação vigente.

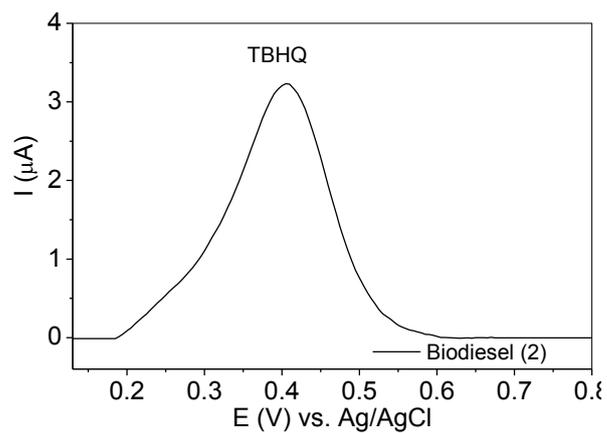
Na Figura 40 estão apresentados os voltamogramas e cromatogramas obtidos na aplicação do método. Observa-se nos cromatogramas das amostras analisadas a presença de outros compostos além dos antioxidantes BHA e TBHQ característico de amostras complexas, o que evidencia as vantagens do método desenvolvido, pois estes compostos não interferiram na determinação voltamétrica simultânea dos antioxidantes.

Figura 40 – Cromatogramas das amostra de (A) Óleo de soja (1), (B) Maionese (1), (C) Margarina (1), (D) Biodiesel (2) e voltamogramas das amostras de (E) Óleo de soja (1), (F) Maionese (1), (G) Margarina (1) e (H) Biodiesel (2).





(D)



(H)

As análises cromatográficas do biodiesel foram realizadas no comprimento de onda de 228 nm, pois em 280 nm o pico da TBHQ apresentou outro composto co-eluído, o que inviabilizou sua determinação no comprimento de onda citado.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos na caracterização por Raman, FT-IR, TGA, SEM e TEM, confirmou-se que a síntese do polímero molecularmente impresso na superfície dos MWCNT foi realizada com sucesso. O sensor apresentou simplicidade, estabilidade e reprodutibilidade no preparo. O efeito sinérgico entre a impressão de hemina e os MWCNT no sensor desenvolvido foi comprovada pela diminuição do ΔE_p e aumento significativo das correntes da TBHQ. Estudos por voltametria cíclica e cronoamperometria mostraram que o sensor CV-MIP-MWCNT apresentou melhor desempenho seletivo para TBHQ em relação ao sensor CV-NIP-MWCNT, sendo um forte indicativo de impressão química no sensor. A separação dos picos anódicos de TBHQ e BHA com o sensor desenvolvido foi adequada. O método foi otimizado por VPD, apresentando limites de detecção próximos aos encontrados na literatura. O sensor demonstrou versatilidade na determinação de TBHQ e BHA, sendo aplicado em vários tipos de amostras complexas, como óleo de soja, maionese, margarina e biodiesel, com resultados estatisticamente idênticos aos obtidos por HPLC, usada como técnica de referência, o que comprova a exatidão do método desenvolvido. A partir das concentrações de TBHQ e BHA encontradas nas matrizes alimentícias analisadas no presente trabalho, verificou-se que todas as amostras apresentaram valores inferiores aos estabelecidos pela ANVISA.

REFERÊNCIAS

ALIZADEH, T.; GANJALI, M. R.; NOROUZI, P.; ZARE, M.; ZERAATKAR, A.. A novel high selective and sensitive para-nitrophenol voltammetric sensor, based on a molecularly imprinted polymer–carbon paste electrode. **Talanta**, v. 79, p. 1197–1203, 2009.

ALIZADEH, T.; GANJALI, M. R.; ZARE, M.; NOROUZI, P.. Development of a voltammetric sensor based on a molecularly imprinted polymer (MIP) for caffeine measurement. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 1568-1574, 2010.

ALTMANN, H. J.; WESTER, P.W.; MATTHIASCHK, G.; GRUNOW, W.; VAN DER HEIJDEN, C. A.. Induction of early lesions in the forestomach of rats by 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA). *Food Chemical Toxicology*, V. 23, p. 723-731, 1985.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - Consolidado da legislação brasileira de aditivos alimentares de 30 de Janeiro de 2014, p. 1-193. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a6809d8047457a1c86c0d63fb c4c6735/Compendio_marco_2011.pdf?MOD=AJPERES> acesso em: 12 abr. 2016.

ARAUJO, T. A. ; BARBOSA, A. M. J.; VIANA, L. H.; FERREIRA, V. S.. Electroanalytical determination of TBHQ, a synthetic antioxidant, in soybean biodiesel samples. **Fuel**, v. 90, p. 707-712, 2011.

ARAÚJO, T. A. DE; BARBOSA, A. M. J. ; VIANA, L. H. ; FERREIRA, V. S.. Voltammetric determination of tert-butyl hydroquinone in biodiesel using a carbon paste electrode in the presence of surfactant. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 409-414, 2010.

AZODI-DEILAMI, S.; ABDOUSS, M.; SEYEDI, S. R.. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymer for controlled release of tramadol. **Central European Journal of Chemistry**, v. 8, p. 687–695, 2010.

BAILEY, A. E.. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 6. ed. (SHAHIDI, F. (Ed.)), New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.. **Electrochemical Methods: fundamentals and applications**. 2. ed. Nova Iorque: Willey-VCH, 2000

BELTRAN, A.; MARCÉ, R.M.; CORMACK, P.A.G.; BORRULL, F.. Synthesis by precipitation polymerisation of molecularly imprinted polymer microspheres for the selective extraction of carbamazepine and oxcarbazepine from human urine **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2248–2253, 2009.

BORSATO, D.; MAIA, E. C. R.; DALL'ANTONIA, L. H.; SILVA, H. C. DA; PEREIRA, J. L.. Cinética da oxidação de biodiesel de óleo de soja em mistura com TBHQ: determinação do tempo de estocagem. **Química Nova**, v. 35, No. 4, p. 733-737, 2012.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P. A.. Intake of Butylated Hydroxyanisole and Butylated

Hydroxytoluene and Stomach Cancer Risk: Results from Analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 599- 605, 2000.

Brahman, P. K. ; Suresh, L. ; Lokesh, V. ; Nizamuddin, S.. Fabrication of highly sensitive and selective nanocomposite film based on CuNPs/fullerene-C60/MWCNTs: An electrochemical nanosensor for trace recognition of paracetamol. **Analytica Chimica Acta**, v. 917, p. 107-116, 2016.

CACHO, J. I.; CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M.. Determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils using microvial insert large volume injection gas-chromatography. **Food Chemistry**, v. 200, p. 249–254, 2016.

CARAMIT, R. P.; ANDRADE, A. G. DE F.; SOUZA, J. B. G. DE; ARAUJO, T. A. DE ; VIANA, L. H.; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S.. A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed electrodes. **Fuel**, v. 105, p. 306–313, 2013.

CARAMIT, R. P.; ARAUJO, A. S. A.; FOGLIATTO, D. K.; VIANA, L. H.; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S.. Carbon-nanotube-modified screen-printed electrodes, a cationic surfactant, and a peak deconvolution procedure: alternatives to provide satisfactory simultaneous determination of three synthetic antioxidants in complex samples. **Analytical Methods**, v. 7, p. 3764-3771, 2015.

CARBALLO, R.; RINALDI, A. L.; DABAS P. C.; REZZANO, I. N.. A carbono nanotube/ Poly[Ni(II)Protoporphyrin IX] composite for amperometric detection of long chain aliphatic amines. **Bioelectrochemistry**, v. 104, p. 51–57, 2015.

CHENG, Z.; LI, Y.. The role of molecular recognition in regulating the catalytic activity of peroxidase-like polymers imprinted by a reductant substrate. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 256, p. 9–15, 2006.

CHENG, Z.; ZHANG, L.; LI, Y.. Synthesis of an Enzyme-like Imprinted Polymer with the Substrate as the Template, and Its Catalytic Properties under Aqueous Conditions. **Chemistry a Euroean Journal**, v.10, p. 3555, 2004.

CHEONG, W. J.; ALI, F.; CHOI, J. H.; LEE, J. O.; SUNG, K. Y.. Recent applications of molecular imprinted polymers for enantio-selective recognition, **Talanta**, v. 06, p. 45–59, 2013.

CHEONG, W. J.; YANG, S.H.; ALI, F.. Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 609-628, 2013.

CLAUSEN, D. N.. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e método de extração para determinação de compostos de interesse farmacêutico e alimentício empregando nanotubo de carbono e polímeros molecularmente impressos**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2014.

CLAUSEN, D. N.; PIRES, I. M. R.; TARLEY, C. R. T.; Improved selective cholesterol adsorption by molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica (PMAA–SiO₂) hybrid material synthesized with different molar ratios. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 99–108, 2014.

Codex Alimentarius. International Food Standards, Food and Agriculture Organization of United Nations, World Health Organizations, General Standard for Food Additives(GSFA), CODEX STAN 192-1995, Revision 1997 – 2015, p. 2-396. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/download/standards/4/CXS_192_2015e.pdf> acesso em: 12 abr. 2016.

CORAZZA, M. Z. ; SOMERA, B. F. ; SEGATELLI, M. G. ; TARLEY, C. R. T. ; Grafting 3-mercaptopropyl trimethoxysilane on multi-walled carbon nanotubes surface for improving on-line cadmium(II) preconcentration from water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v.243, p. 326– 333, 2012.

CORAZZA, M. Z.. **Preparo de fases sorventes baseadas em nanotubos de carbono modificados e matrizes poliméricas: Aplicação em estudos de pre-concentração/especiação de íons metálicos**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2014.

CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z.; Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 173-182, 2004.

DING, M.; ZOU, J.. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1051–1055, 2012.

DINIZ, K. M.. **Síntese do copolímero híbrido orgânico/inorgânico poli(etileno glicol dimetacrilato – protoporfirina)-Sílica e aplicação em sistema de extração em fase sólida on-line de íons Cd²⁺ acoplada a espectrometria de absorção atômica com chama** . Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2013.

Dolatabadi, J. E. N.; Kashanian, S.. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. **Food Research International**, v. 43, p. 1223-1230, 2010.

Du, Y.; Gao, X.; Ye, X.; Zheng, Z.; Feng, Q.; Wang, C.; Wu, K.. Composition and architecture-engineered Au–SnO₂/GNs-SWCNTs nanocomposites as ultrasensitive and robust electrochemical sensor for antioxidant additives in foods. **Sensors and Actuators B**, v. 203, p. 926–934, 2014.

DUARTE, E. H.; KUBOTA, L. T.; TARLEY, C. R. T.; Carbon Nanotube Based Sensor for Simultaneous Determination of Acetaminophen and Ascorbic Acid Exploiting Multiple Response Optimization and Measures in the Presence of Surfactant. **Electroanalysis**, v. 24, n. 12, p. 2291-2301, 2012.

EFSA - European Food Safety Authority, Regulamento da comissão (UE) No 1129/2011 de 11 de novembro de 2011, p. 1-177– disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:PT:PDF>> acesso em: 12 abr. 2016.

ESKANDANI, M.; HAMISHEHKAR, H.; DOLATABADI, J. E. N.. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. **Food Chemistry**, v. 153, p. 315–320, 2014.

FENG, Q.; CHEN, Y.; XU, D.; LIU, L.; ZHANG, Z.. Molecularly Imprinted Micro-Solid-Phase Extraction for the Selective Determination of Phenolic Compounds in Environmental Water Samples with High Performance Liquid Chromatography. **Open Journal of Polymer Chemistry**, v 3, p. 54-62, 2013.

FERRARI, A. C.; ROBERTSON, J.. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon. **Physical Review B**, v. 61, nº 20, p. 14095-14107, 2000.

FERREIRA, H. M.; RANGEL, M. C.. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FILHO, W. P. de O.. **Utilização de Cromatografia em fase gasosa para a determinação de antioxidantes sintéticos em biodiesel: uma abordagem metrológica**. Tese (Doutorado em Química), IQSC - Universidade de São Paulo, Brasil, 2013.

FONSECA, C. C.. **Desenvolvimento de procedimentos espectrofluorimétricos para a determinação de cetoconazol e tbhq em amostras de interesse ambiental, alimentício e farmacêuticos**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal Da Grande Dourados, Brasil, 2013.

FONSECA, R. J.; SEGATELLI, M. G.; BORGES, K. B.; TARLEY, C. R. T.. Synthesis and evaluation of different adsorbents based on poly(methacrylic acid–trimethylolpropane trimethacrylate) and poly(vinylimidazole–trimethylolpropane trimethacrylate) for the adsorption of tebutiuron from aqueous medium. **Reactive and Functional Polymers**, v. 93, p. 1-9, 2015.

GAO, Z.; BANDOSZC, T.J.; ZHAO, Z.; HAN, M.; QIU, J.; Investigation of factors affecting adsorption of transition metals on oxidized carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, v.167, p. 357–365, 2009.

GODOY, N. V.; PEREIRA, J. L.; DUARTE, E. H.; TARLEY, C. R. T.; SEGATELLI, M. G.. Influence of activated charcoal on the structural and morphological characteristics of ceramic based on silicon oxycarbide (SiOC): A promising approach to obtain a new electrochemical sensing platform. **Materials Chemistry and Physics**, p. 175, p.33-45, 2016.

GORLA, F. A.; DUARTE, E. H.; SARTORI, E. R.; TARLEY, C. R. T.. Electrochemical study for the simultaneous determination of phenolic compounds and emerging pollutant using an electroanalytical sensing system based on carbon nanotubes/surfactant and multivariate approach in the optimization. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 65–75, 2016.

GOULART, L. A.; TEIXEIRA, A. R. L.; RAMALHO, D. A.; TEREZO, A. J.; CASTILHO, M.. Development of an analytical method for the determination of tert-butyl hydroquinone in soybean biodiesel. **Fuel**, v.115, p.126–131, 2014.

HERBST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.; ROCCO, A. M.. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986-992, 2004.

HESS, M. A.; HAAS, M. J.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N.. Effect of Antioxidant Addition on NO_x Emissions from Biodiesel. **Energy & Fuels**, v.19, p. 1749-1754, 2005.

HU, X.; DAI, G.; HUANG, J.; YE, T.; FAN, H.; YOUWEN, T.; YU, Y. ; LIANG, Y.. Molecularly imprinted polymer coated on stainless steel fiber for solid-phase microextraction of chloroacetanilide herbicides in soybean and corn. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5875–5882, 2010.

HUDARI, F. F.; DUARTE, E. H.; PEREIRA, A. C.; DALL'ANTONIA, L. H.; KUBOTA, L. T.; TARLEY, C. R. T.. Voltammetric method optimized by multi-response assays for the simultaneous measurements of uric acid and acetaminophen in urine in the presence of surfactant using MWCNT paste electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 686, p. 52-58, 2013.

IJIMA, S.. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HAGIWARA, A.; SHIBATA, M.; OGISO, T.. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 7, p. 343-352, 1983.

JAIN, S.; SHARMA, M.P.. Effect of metal contaminants and antioxidants on the storage stability of *Jatropha curcas* biodiesel. **Fuel**, v. 109, p. 379-383, 2013.

JANEGITZ, B. C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A.; FATIBELLO-FILHO, O.. Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 158, n. 1, p. 411-417, 2011.

JUROW, M.; SCHUCKMAN, A. E.; BATTEAS, J. D.; DRAIN, C. M.. Porphyrins as molecular electronic components of functional devices. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 2297-2310, 2010.

KARIMI, M.; ABOUFAZELI, F. ; ZHAD, H. R. L. Z. ; SADEGHI, O. ; NAJAFI, E.. Determination of Sulfonamides in Chicken Meat by Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Coupled to HPLC-UV. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 73–80, 2014.

KASHANIAN, S.; DOLATABADI, J. E. N.. DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. **Food Chemistry**, v. 116, p. 743-747, 2009.

KILIAN, K.; PYRZINSKA, K.. Spectrophotometric study of Cd(II), Pb(II), Hg(II) and Zn(II) complexes with 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxylphenyl)porphyrin. **Talanta**, v. 60, p. 669-678, 2003.

KIM, M. ; HONG, J. ; HONG, C. K. ; SHIM, S. E.; Preparation of silica-layered multi-walled carbon nanotubes activated by grafting of poly(4-vinylpyridine). **Synthetic Metals**, v.159, p. 62–68, 2009.

KIM, M.; HONG, J.; HONG, C. K.; SHIM, S. E.. Preparation of silica-layered multi-walled carbon nanotubes activated by grafting of poly(4-vinylpyridine). **Synthetic Metals**, v. 159, p. 62–68, 2009.

LAURIAULT, V.; GRASSO, P.; POWELL, C.J.. Butylated hydroxyanisole (BHA) does not cause forestomach hyperplasia by inhibiting the release of gastric mucus. **Toxicology**, v. 64, p. 281-290, 1990.

LAVIRON, E.. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 101, p. 19-28, 1979.

LEE, SUNG-CHUAN ; CHUANG, FENG-LIN; TSAI, YEN-LING; CHEN, H.. Studies on the preparation and properties of sol-gel molecularly imprinted polymer based on tetraethoxysilane for recognizing sulfonamides. **Journal of Polymers Research**, v. 17, p. 737–744, 2010.

LI , XIAO-LAN; MENG, DONG-LING; ZHAO, J.; YANG, YA-LING. Determination of synthetic phenolic antioxidants in essence perfume by high performance liquid chromatography with vortex-assisted, cloud-point extraction using AEO-9. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, p. 1198, 2014.

LIN, X.; NI, Y.; KOKOT, S.. Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 765, p. 54-62, 2013.

LIU, H.-J.; YANG, D.-W.; LIU, H.-H.. A hydrogen peroxide sensor based on the nanocomposites of poly(brilliant cresyl blue) and single walled-carbon nanotubes. **Analytical Methods**, v. 4, p. 1421-1426, 2012.

LIU, X.; FENG, H.; ZHANG, J.; ZHAO, R. ; LIU, X. ; WONG, D. K.Y.. Hydrogen peroxide detection at a horseradish peroxidase biosensor with a Au nanoparticle-dotted titanate nanotube/hydrophobic ionic liquid scaffold. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, p. 188-194, 2012.

LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D.. Limit of detection, a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 712 – 724, 1983.

Ma, Y.; Pan, J.; Zhang, G.; Zhang, Y.. Binding properties of butylated hydroxytoluene with calf thymus DNA in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 126, p. 112-118, 2013.

MARESTONI, L. D.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; SEGATELLI, M. G.; SARTORI, L. R.; TARLEY, C. R. T.. Ion imprinted polymers: fundamentals, preparation strategies and applications in analytical chemistry. **Química Nova**, v. 36, p. 1194-1207, 2013.

MATA, K.; CORAZZA, M. Z.; OLIVEIRA, F. M.; TOFFOLI, A. L.; TARLEY, C. R. T.; MOREIRA, A. B.. Synthesis and characterization of cross-linked molecularly imprinted polyacrylamide for the extraction/preconcentration of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from water samples. **Reactive and Functional Polymers**, v. 83, p. 76-83, 2014.

MAYES, A. G.; WHITCOMBE, M. J.. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1742-1748, 2005.

MCCORMICK, R. L.; WESTBROOK, S. R.. Storage Stability of Biodiesel and Biodiesel Blends, **Energy Fuels**, v. 24, p. 690–698, 2010.

MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C.; FATIBELLO-FILHO. O.. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. **Food Chemistry**, v. 123, p. 886-891, 2010.

MIJANGOS, IRENE.; NAVARRO-VILLOSLADA, F.; GUERREIRO, A. ; PILETSKA, E.; CHIANELLA, I.; KARIM, K.; TURNER, A.; PILETSKY, S.. Influence of initiator and different polymerisation conditions on performance of molecularly imprinted polymers, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 381-387, 2006.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; LARA, F. J.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPANA, A. M.. Molecularly imprinted polymer as in-line concentrator in capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for the determination of quinolones in bovine milk samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 1–8, 2014.

MUTHU, R. N.; RAJASHABALA, S.; KANNAN, R.. Hexagonal boron nitride (h-BN) nanoparticles decorated multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) for hydrogen storage. **Renewable Energy**, v. 85, p. 387-397, 2015.

NAGAI, F.; OKUBO, T.; USHIYAMA, K.; SATOH, K.; KANO, I.. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in calf thymus DNA treated with tert-butylhydroquinone, a major metabolite of butylated hydroxyanisole. **Toxicology Letters**, v.89, p.163-167, 1996.

NENKOVA, R.; IVANOVA, D.; VLADIMIROVA, J.; GODJEVARGOVA, T.. New amperometric glucose biosensor based on cross-linking of glucose oxidase on silica gel/multiwalled carbon nanotubes/polyacrylonitrile nanocomposite film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 148, n. 1, p. 59-65, 2010.

NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E.. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

NETO, J. R. M.; SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T.. A hemin-based molecularly imprinted polymer (MIP) grafted onto a glassy carbon electrode as a selective sensor for 4-aminophenol amperometric. **Sensors and Actuators B**, v. 152, p. 220–225, 2011.

NI, Y.; WANG, L.; KOKOT, S.. Voltammetric determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and tert-butylhydroquinone by use of chemometric approaches. **Analytica Chimica Acta**, v. 412, p. 185–193, 2000.

OLIVEIRA, T. F.. **Síntese, caracterização e avaliação do copolímero poli(proto porfirina-co-vinilpiridina) em estudos de absorção e pré-**

concentração on-line de manganês em sistema FIA-FAAS. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2013.

OLIVEIRA, T. F.; RIBEIRO, E. S.; SEGATELLI, M. G.; TARLEY, C. R. T.. Enhanced sorption of Mn²⁺ ions from aqueous medium by inserting protoporphyrin as a pendant group in poly(vinylpyridine) network. **Chemical Engineering Journal**, v. 221, p. 275-282, 2013.

OLIVEIRA, T.R.; GRAWE, G.F.; MOCCELINI, S.K.; TEREZO, A.J.; CASTILHO, M.. Enzymatic biosensors based on ingá-cipó peroxidase immobilised on sepiolite for TBHQ quantification. **Analyst**, v. 139, p. 2214-2220, 2014.

PARDESHI, S.; DHODAPKAR, R.; KUMAR, A.. Molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared using precipitation polymerisation method for selective extraction of gallic acid from *Embllica officinalis*. **Food Chemistry**, v.146, p. 385–393, 2014.

PEREIRA, T. M. M.. **Caracterização térmica (TG/DTG, DSC, DSC-fotovisual) de hormônios bioidênticos.** Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, 2013.

PIMENTA, M. A.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S.; CANÇADO, L. G.; JORIO, A.; SAITO, R.. Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.9, p. 1276-1291, 2007.

PRASAD, B. B.; MADHURI, R.; TIWARI, M. P.; SHARMA, P. S. Imprinting molecular recognition sites on multiwalled carbon nanotubes surface for electrochemical detection of insulin in real samples. **Electrochimica Acta**, v.55, p. 9146–9156, 2010.

QIU, L.; LIU, W.; HUANG, M.; ZHANG, L.. Preparation and application of solid-phase microextraction fiber based on molecularly imprinted polymer for determination of anabolic steroids in complicated samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7461–7470, 2010.

QUESADA-MOLINA, C.; CLAUDE, B. ; GARCIA-CAMPANA, A. M.; OLMO-IRUELA, M.; MORIN, P.. Convenient solid phase extraction of cephalosporins in milk using a molecularly imprinted polymer. **Food Chemistry**, v.135, p.775–779, 2012.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N.. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.

RAYMUNDO, M. S.; PAULA, M. M. DA S.; FRANCO, C.; FETT, R.. Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques. **LWT**, v. 40, p. 1133-1139, 2007.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T.. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, No. 1, p. 77-86, 2001.

RUZGAS, T.; CSÖREGI, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G.. Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. **Analytica Chimica Acta**, v. 330, p. 123-138, 1996.

RUZGAS, T.; EMNÉUS, J. ; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G.. The development of a peroxidase biosensor for monitoring phenol and related aromatic compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 311, p. 245-253, 1995.

SAAD, B.; SING, Y. Y.; NAWI, M. A.; HASHIM, N.; ALI, A. S. M.; SALEH, M. I.; SULAIMAN, S. F.; TALIB, K. MD; AHMAD, K.. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. **Food Chemistry**, v. 105, p. 389-394, 2007.

SADEGHI, S.; JAHANI, M.. Selective solid-phase extraction using molecular imprinted polymer sorbent for the analysis of Florfenicol in food samples. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1242–1251, 2013.

SADEGHI, S.; MOTAHARIAN, A.. Voltammetric sensor based on carbon paste electrode modified with molecular imprinted polymer for determination of sulfadiazine in milk and human serum. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, p. 4884-4891, 2013.

SALVETAT, J.-P.; BONARD J.-L.; THOMSON, N. H.; KULIK, A. J.; FORRÓ, L.; BENOIT, W.; ZUPPIROLI, L.. Mechanical properties of carbon nanotubes. **Applied Physics A**, v. 69, n. 3, p. 255-260, 1999.

SANTOS, R. D.. **Compostos fenólicos de ervas Lamiaceae na estabilidade oxidativa da manteiga e avaliação da toxicidade de extrato de alecrim (Rosemarinus Officinalis L.)**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2014.

SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOT, L. T.; Synthesis, Characterization and Kinetics of Catalytically Active Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Recognition of 4-Aminophenol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, No. 5, p. 820-825, 2009.

SARTORI, L. R.; SANTOS, W. DE J. R.; KUBOTA, L. T.; SEGATELLI, M. G.; TARLEY, C. R. T.. Flow-based method for epinephrine determination using a solid reactor based on molecularly imprinted poly(FePP–MAA–EGDMA). **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 114–119, 2011.

SATAKE, A.; MYIAJIMA, Y.; KOBUE, Y. Porphyrin-nanotube composites formed by noncovalent polymer wrapping. **Chemistry of Materials**, v. 17, p. 716-724, 2005.

SEYHAN, S.; MERDIVAN, M.; DEMIREL, N.; HOSGOREN, H.. Polymer supported 5,10,15,20-tetrakis(phenoxy acetic acid)porphyrin derivative for separation and preconcentration of d- and f-electron metals. **Microchimica acta**, v. 161, p. 87-93, 2008.

SHANMUGHARAJ, A. M.; BAE, J.H.; LEE, K. Y.; NOH, W. H.; LEE, S. H.; RYU, S. H.. Physical and chemical characteristics of multiwalled carbon nanotubes functionalized with aminosilane and its influence on the properties of natural rubber composites. **Composites Science and Technology**, v. 67, p. 1813-1822, 2007.

SHARMA, V. K.; JELEN, F.; TRNKOVA, L.. Functionalized Solid Electrodes for Electrochemical Biosensing of Purine Nucleobases and Their Analogues: A Review. **Sensors**, v. 15, p. 1564-1600, 2015.

SHIMADA, T.; SUGAI, T.; FANTINI, C.; SOUZA, M.; CANÇADO, L.G.; JORIO, A.; PIMENTA, M. A.; SAITO, R.; GRÜNEIS, A.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S.; OHNO, Y.; MIZUTANI, T.; SHINOHARA, H.. Origin of the 2450 cm⁻¹ Raman bands in HOPG, single-wall and double-wall carbon nanotubes. **Carbon**, v. 43, p. 1049-1054, 2005.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – BHA**. 2016a. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=B1253&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3Dbha%26interface%3DAI%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Dpt%26region%3DBR%26focus%3Dproduct>> Acesso em: 11 abr. 2016.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – TBHQ**. 2016b. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=112941&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3Dtqh%26interface%3DAI%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Dpt%26region%3DBR%26focus%3Dproduct>> Acesso em: 11 abr. 2016.

SKOOG, A. D.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, R. S.; **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002

SOMERA, B. F.; CORAZZA, M. Z.; YABE, M. J. S.; SEGATELLI, M. G.; GALUNIN, E.; TARLEY, C. R. T.; 3-mercaptopropyltrimethoxysilane-Modified Multi-walled Carbon Nanotubes as a New Functional Adsorbent for Flow Injection Extraction of Pb(II) from Water and Sediment Samples. **Water Air Soil Pollut**, v. 223, p. 6069–6081, 2012.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

STEVENSON, D.. Molecular imprinted polymers for solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n 3, p. 154-158, 1999.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. DEL 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, Nº. 6, p. 1076-1086, 2005a.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. DEL 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, no. 6, p. 1087-1101, 2005b.

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A.. Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. **Talanta**, v. 99, p. 527-531, 2012.

TORMIN, T. F.; GIMENES, D. T.; SILVA, L. G.; RUGGIERO, R.; RICHTER, E. M.; FERREIRA, V. S.; MUÑOZ, R. A. A.. Direct amperometric determination of tert-butyl hydroquinone in biodiesel. **Talanta**, v. 82, p. 1599–1603, 2010.

WANG, J.; **Analytical Electrochemistry**. 2. ed. Nova Iorque: Wiley-VCH, 2000.

WONG, A.; FOGUEL, M. V.; KHAN, S.; OLIVEIRA, F. M.; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.. Development of an Electrochemical Sensor Modified with MWCNT-COOH and Mip for Detection of Diuron. **Electrochimica Acta**, v. 182, p. 122–130, 2015.

YAN, H.; ROW, K. H.. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. **International Journal of Molecular Sciences**, v.7, p.155-178, 2006.

YANG, MIN-HUA; LIN, HSIU-JUNG; CHOONG, YOUK-MENG. A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. **Food Research International**, v. 35, p. 627–633, 2002.

YANG, Z.; PU, H.; YIN, J.; Covalent functionalization of multiwalled carbon nanotubes by polyvinylimidazole. **Materials Letters**, v.59, p. 2838 – 2841, 2005.

YIN, H.; AI, S.; SHI, W.; ZHU, L.. A novel hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on gold nanoparticles–silk fibroin modified glassy carbon electrode and direct electrochemistry of horseradish peroxidase. **Sensors and Actuators B**, v. 137, p. 747-753, 2009.

YUE, X.; SONG, W.; ZHU, W.; WANG, J.; WANG, Y.. In situ surface electrochemical co-reduction route towards controllable construction of AuNPs/ERGO electrochemical sensing platform for simultaneous determination of BHA and TBHQ. **Electrochimica Acta**, v. 182, p. 847-855, 2015.

ZHANG, H.; ZHANG, Z.; HU, Y.; YANG, X.; YAO, S.. Síntese de um Novel Composite Imprinted material Baseado em multicamadas nanotubos de carbono como uma seletiva melamina absorvente. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 59, p. 1063–107, 2011.

ZHANG, M.; HUANG, J.; YU, P.; CHEN, X.. Preparation and characteristics of protein molecularly imprinted membranes on the surface of multiwalled carbon nanotubes. **Talanta**, v. 81, p. 162–166, 2010.

ZHANG, Y.; XIA, Z.; LIU, H.; YANG, M.; LIN, L.; LI, Q.. Hemin-graphene oxide-pristine carbon nanotubes complexes with intrinsic peroxidase-like activity for the detection of H₂O₂ and simultaneous determination for Trp, AA, DA, and UA. **Sensors and Actuators B**, v. 188, p. 496-501, 2013.

ZHANG, Y.; YUAN, R.; CHAI, Y. Q.; WANG, J. F.; ZHONG, H. A.. Amperometric biosensor for nitrite and hydrogen peroxide based on hemoglobin immobilized on gold nanoparticles/polythionine/platinum nanoparticles modified glassy carbon electrode. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 570-574, 2012.

ZHAO, P.; HAO, J.. Tert-butylhydroquinone recognition of molecular imprinting electrochemical sensor based on core-shell nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1001-1007, 2013.

ZOU, H. L.; LI, B. L.; LUO, H. Q.; LI, N. B.. A novel electrochemical biosensor based on hemin functionalized graphene oxide sheets for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Sensors and Actuators B**, v. 207, p. 535-541, 2015.