



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS
PARA QUALIFICAÇÃO DE ÓLEOS DE COPAÍBA

Igor Medeiros de Assis

MANAUS
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS
PARA QUALIFICAÇÃO DE ÓLEOS DE COPAÍBA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado em Química, com área de concentração em Química de Materiais.

Igor Medeiros de Assis

Orientador: Prof. Dr. Walter Ricardo Brito

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Brambilla de Souza

MANAUS
2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A848d Assis, Igor Medeiros
Desenvolvimento de sensores eletroquímicos para qualificação
de óleo de copaíba / Igor Medeiros Assis. 2019
126 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Walter Ricardo Brito
Coorientador: Rodrigo Fernando Brambilla de Souza
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Copaíba. 2. Adulterante. 3. Molecularly Imprinted Polymer. 4.
Sensor. 5. Polianilina. I. Brito, Walter Ricardo II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

“Desenvolvimento de sensores eletroquímicos para qualificação de óleos de copaíba”

Igor Medeiros de Assis

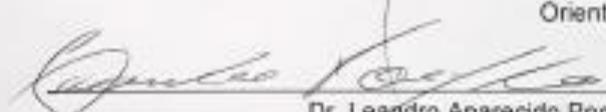
Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor(a) em Química.

Aprovado, em 26 de abril de 2019.

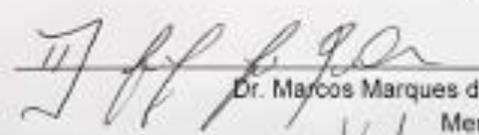
BANCA EXAMINADORA



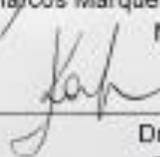
Dr. Walter Ricardo Brito
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



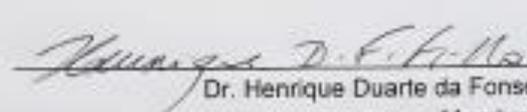
Dr. Leandro Aparecido Pocrifka
Membro UFAM



Dr. Marcos Marques da Silva Paula
Membro Externo



Dr.ª Karen Segala
Membro Externo



Dr. Henrique Duarte da Fonseca Filho
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 26 de abril de 2019.

Dedico este trabalho às minhas queridas, amadas, amigas e companheiras Edinilza Medeiros (Melhor mãe do mundo) e a minha noiva Carine Pereira, pelo amor, carinho e dedicação a mim, sendo muito compreensivas e pacientes nos meus momentos de desânimo e estresse.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me dar “luz” nos momentos mais difíceis ao longo dessa dolorosa e ardorosa caminhada.

Ao Prof. Dr. Walter Ricardo Brito pela amizade, paciência e orientação, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Fernando Brambilla de Souza no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Aimêe Oliveira, Luciana Freire, Fabiano Vargas e Victor Cassiano, pelos momentos de descontração e companheirismo ao longo desses anos.

À Oneide Moraes, amiga e companheira de doutorado que me fez o convite para trabalhar com sensores em 2014.

Aos meus amigos João Vitor e Fernando Alves.

Ao meu amigo e companheiro de trabalho Claudionor Barbosa.

Ao meu amigo de trabalho, conversas e risadas Ronald Rastre.

A todos os alunos de iniciação científica que me ajudaram nesses últimos tempos, em especial à Letícia Filardi.

À minha segunda família, D. Vilma, Seu Carlos, Vanessa, Sidarta, e aos meus bebês Beatriz e Benjamin.

Aos alunos do grupo Label pela ajuda no laboratório.

À Ingridy, Rochelly Lilian, Maiara, Marcos, Leonard, André pelos momentos de descontração e trabalho no laboratório LAEQ.

Ao Prof. Dr. Paulo Couceiro e ao Matheus pelas análises de espectroscopia de infravermelho.

Aos professores da Pós-graduação em Química PPGQ-UFAM pelas aulas ministradas contribuindo na minha formação.

A Prof. Dra. Virginia Mansanares Giacon, responsável pelo Laboratório de Materiais da Amazônia e Compósitos – LAMAC, e ao técnico Diogo Milone pelas análises térmicas.

Aos Profs Drs. Marcos Marques, Yurimiler Leyet e Yonny Romaguera-Barcelay pelas contribuições no Exame de Qualificação.

A CAPES, pelo apoio financeiro, necessário para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O presente projeto trata sobre o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para qualificação de óleos de copaíba, apresentando uma solução viável que possibilite a detecção de adulterantes e de substâncias consideradas marcadores moleculares como β -cariofileno e óxido de cariofileno. O uso de sensores eletroquímicos em substituição às técnicas utilizadas atualmente é uma forma viável de realizar um controle de qualidade dos óleos de copaíba na detecção de adulterantes, β -cariofileno e óxido de cariofileno. Os polímeros molecularmente impressos, que foram utilizados para a detecção dos marcadores, foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas e de análise térmica. Da análise dos resultados das técnicas de caracterização foi selecionado o poli(ácido acrílico). Estudos eletroquímicos por voltametria cíclica demonstraram a seletividade dos eletrodos de carbono modificados com os MIP's na detecção das respectivas moléculas. Foram realizados estudos de voltametria de onda quadrada possibilitou detectar os intervalos de concentração entre $1,5$ e $7,5 \times 10^{-7}$ M, e 5×10^{-8} e $3,5 \times 10^{-7}$ M para β -cariofileno e óxido de cariofileno, respectivamente. Estudos sobre a detecção de adulterantes utilizando eletrodos de PANI possibilitaram realizar a detecção do principal adulterante relatado nos óleos de copaíba, o óleo de soja. A detecção de adulterante foi realizada em intervalo de concentração entre $1,01 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-6}$ M.

Palavras chave: β -cariofileno; óxido de cariofileno; MIP; eletrodo de pasta de carbono; adulterante; copaíba; sensor eletroquímico.

ABSTRACT

The present project deals with the development of electrochemical sensors for the qualification of copaiba oils, presenting a viable solution that allows the detection of adulterants and substances considered a molecular markers such as β -caryophyllene and caryophyllene oxide. The use of electrochemical sensors in substitution of the current techniques is a viable way of performing a quality control of copaiba oils in the detection of adulterants, β -caryophyllene and caryophyllene oxide. Molecularly printed polymers, which were used for the detection of markers, were characterized by spectroscopic techniques and thermal analysis. From the analysis of the results of the characterization techniques, poly (acrylic acid) was selected. Electrochemical studies by cyclic voltammetry demonstrated the selectivity of the carbon electrodes modified with the MIP's in the detection of the respective molecules. We performed square wave voltammetry studies studies that allowed detecting concentration ranges between 1.5 and 7.5×10^{-7} M, and 5×10^{-8} and 3.5×10^{-7} M for β -caryophyllene and oxide of caryophyllene, respectively. Studies on the detection of adulterants using PANI electrodes made it possible to detect the main adulterant reported in copaiba oils, soybean oil. The adulterant detection was performed in the concentration range between 1.01×10^{-6} and 4.0×10^{-6} M.

Keywords: β -caryophyllene; caryophyllene oxide; MIP; Carbon paste electrode; adulterant; copaíba; Electrochemical sensor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Configuração de um sensor eletroquímico, mostrando a organização dos seus componentes funcionais	8
Figura 2: Representação esquemática da síntese dos <i>MIP's</i>	10
Figura 3: Estrutura dos sesquiterpenos A) óxido de cariofileno; B) β -cariofileno	11
Figura 4: Monômeros acrilamida, ácido acrílico e ácido metacrílico	11
Figura 5: Estrutura da PANI	14
Figura 6: Estados de oxidação da PANI.....	15
Figura 7: Esquema da interconversão dos estados de oxidação da PANI e o mecanismo de dopagem protônica	16
Figura 8: Esquema de síntese dos MIP's com seus respectivos monômeros e moléculas moldes	18
Figura 9: Esquema de preparação do eletrodo modificado com MIP	22
Figura 10: Esquema do procedimento de análise dos óleos utilizando o eletrodo funcionalizado com PANI	25
Figura 11: Imagens de microscopia de varredura eletrônica dos MIP's e NIP's. Legenda: aa – ácido acrílico; am – ácido metacrílico; acda – acrilamida; b - β -cariofileno; (aumento de 22.000 vezes)	26
Figura 12: Imagens de microscopia de varredura eletrônica dos MIP's e NIP's. Legenda: am – ácido metacrílico; acda – acrilamida; b - β -cariofileno; (aumento de 22.000 vezes).....	27
Figura 13a: Curvas TG's dos MIP's e NIP poli(ácido acrílico) e do padrão de β -cariofileno.....	28
Figura 13b: Curvas TG's dos MIP's e NIP poli(ácido metacrílico) e do padrão de β -cariofileno.....	28
Figura 13c: Curvas TG's dos MIP's e NIP poliacrilamida e do padrão de β -cariofileno.....	28
Figura 14: Espectros na região do infravermelho do sesquiterpeno β -cariofileno	30
Figura 15: Espectro na região do infravermelho do NIP de acrilamida	32
Figura 16: Espectros na região do infravermelho de β -cariofileno e seus respectivos NIP, e MIP's depois da extração de antes da extração.	33
Figura 17: Espectros dos MIP's antes e depois da extração de β -cariofileno	33
Figura 18: Espectro na região do infravermelho do NIP de ácido metacrílico	34

Figura 19: Espectros na região do infravermelho de β -cariofileno e seus respectivos NIP, e MIP's depois da extração de antes da extração	35
Figura 20: Espectros dos MIP's antes e depois da extração de β -cariofileno	35
Figura 21: Espectro na região do infravermelho do NIP de ácido acrílico	36
Figura 22: Espectros na região do infravermelho de β -cariofileno seus respectivos NIP, e MIP's depois da extração de antes da extração	37
Figura 23: Espectros dos MIP's antes e depois da extração de β -cariofileno	38
Figura 24: Esquema de síntese e interação do β -cariofileno com MIP	39
Figura 25: Espectro Raman dos polímeros NIP e MIP's antes e depois da extração.....	40
Figura 26: Espectros de XPS de alta resolução dos níveis de núcleo de C1s (a) e O1s (b) para MIP antes e depois da remoção do β -cariofileno e do NIP.....	41
Figura 27: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos NIP, MIP's antes e depois da extração	43
Figura 28: a) VOD do eletrodo MIP depois da extração em diferentes concentrações de β -cariofileno. Faixa de concentrações de β -cariofileno utilizadas, a – f: $1,5 \times 10^{-7}$, $2,5 \times 10^{-7}$, $3,5 \times 10^{-7}$, 5×10^{-7} , 6×10^{-7} e $7,5 \times 10^{-7}$ M, respectivamente. A relação linear entre a corrente de pico e a concentração de β -cariofileno na faixa de $1,5 \times 10^{-7}$ - $7,5 \times 10^{-7}$ M	44
Figura 29: Aplicação real: testes de detecção do β -cariofileno em amostra de óleo de copaíba <i>in natura</i> . A – Triplicata da concentração de 3×10^{-7} mol/L; B - Triplicata da concentração de $5,5 \times 10^{-7}$ mol/L.....	46
Figura 30: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos MIP's e NIP's. Legenda: aa – ácido acrílico; o – óxido de cariofileno; (aumento de 22.000 vezes)	47
Figura 31: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos MIP's e NIP's. Legenda: am – ácido metacrílico; acda – acrilamida; o – óxido de cariofileno; (aumento de 22.000 vezes).....	48
Figura 32a: Curvas TG's dos MIP's e NIP poli(ácido acrílico) e do padrão de óxido de cariofileno.....	49
Figura 32b: Curvas TG's dos MIP's e NIP poli(ácido metacrílico) e do padrão de óxido de cariofileno.....	49
Figura 32c: Curvas TG's dos MIP's e NIP poli(acrilamida) e do padrão de óxido de cariofileno.....	49

Figura 33: Diferenças estruturais entre β -cariofileno e óxido de cariofileno	51
Figura 34: Espectros na região do infravermelho dos sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno	52
Figura 35: Espectro na região do infravermelho do NIP de acrilamida	54
Figura 36: Espectros na região do infravermelho de óxido de cariofileno seus respectivos NIP, e MIP's antes e depois da extração	55
Figura 37: Espectros dos MIP's antes e depois da extração de óxido de cariofileno.....	55
Figura 38: Espectro na região do infravermelho do NIP de ácido metacrílico	56
Figura 39: Espectros na região do infravermelho de óxido de cariofileno seus respectivos NIP, e MIP's depois da extração de antes da extração	57
Figura 40: Espectros dos MIP's antes e depois da extração de óxido de cariofileno.....	58
Figura 41: Espectro na região do infravermelho do NIP de ácido acrílico	59
Figura 42: Espectros na região do infravermelho de óxido de cariofileno seus respectivos NIP, e MIP's depois da extração de antes da extração	59
Figura 43: Espectros dos MIP's antes e depois da extração de óxido de cariofileno.....	60
Figura 44: Esquema de síntese e interação do óxido de cariofileno com MIP.....	61
Figura 45: Voltamogramas dos eletrodos NIP, MIP antes e depois da extração.....	62
Figura 46: a) VOD do eletrodo MIP depois da extração em diferentes concentrações de β -cariofileno. Faixa de concentrações de β -cariofileno utilizadas, a – f: $3,5 \times 10^{-8}$, 5×10^{-8} , $7,5 \times 10^{-8}$, $1,5 \times 10^{-7}$, $2,5 \times 10^{-7}$ e $3,5 \times 10^{-7}$ M, respectivamente. A relação linear entre a corrente de pico e a concentração de β -cariofileno na faixa de $3,5 \times 10^{-8}$ - $3,5 \times 10^{-7}$ M	64
Figura 47: Aplicação real: testes de detecção do óxido de cariofileno em amostra de óleo de copaíba <i>in natura</i> . A - Triplicata da concentração de 1×10^{-7} mol/L; B – Triplicata da concentração de $3,5 \times 10^{-7}$ mol/L.....	65
Figura 48: Imagem de microscopia eletrônica de varredura do filme de PANI (aumento de 5.000 vezes).....	68
Figura 49: Voltamogramas cíclicos dos 10 primeiros ciclos do processo de polimerização do filme de PANI	70
Figura 50: Voltamograma cíclico típico de polianilina (sal de esmeraldina)	71

Figura 51: Voltametria cíclica dos crescimentos poliméricos.....	72
Figura 52: Sobreposição dos perfis voltamétricos dos eletrodos de ouro com e sem PANI imersos em solução NaOH 5 mol/L	73
Figura 53: Perfil voltamétrico do eletrodo PANI imergido na mistura NaOH e óleo de soja.....	74
Figura 54: Sobreposição dos perfis voltamétricos dos eletrodos PANI imersos em solução NaOH 5 mol/L e na adição de óleo de soja na solução NaOH 5 mol/L.....	74
Figura 55: Sobreposição dos perfis voltamétricos dos eletrodos PANI imersos em solução NaOH 5 mol/L, e após adição de copaíba na solução NaOH 5 mol/L	76
Figura 56: Biossíntese dos terpenos e ácido graxos (adaptado de DEWICK, 2002)	78
Figura 57: Sobreposição dos perfis voltamétricos dos eletrodos PANI imersos em solução NaOH 5 mol/L após adição de copaíba e óleo de soja	78
Figura 58: Sobreposição dos perfis voltamétricos do adulterante e da copaíba adulterada	79
Figura 59: a) Representação da intensidade do pico em função da concentração de adulterante nas condições de análise otimizada. Faixa de concentrações do adulterante utilizadas, a – d: $1,01 \times 10^{-6}$, $2,05 \times 10^{-6}$, $2,97 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol}^{-1}$, respectivamente. b) A relação linear entre a corrente de pico e a concentração do adulterante na faixa nas respectivas concentrações utilizadas.....	80
Figura 60: Aplicação real: testes de detecção do adulterante em amostra de óleo de copaíba <i>in natura</i> . A - Triplicata da concentração de $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; B - Triplicata da concentração de $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$	81

LISTA DE SÍMBOLOS SIGLAS E ABREVIACÕES

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

MIP - Molecularly Imprinted Polymer

PFNM - Produto Florestal Não Madeireiro

CGET - Centro De Gestão E Estudos Estratégicos

CG-EM - Cromatografia Gasosa Acoplada A Um Espectrômetro De Massas

NaOCH₃ - Metóxido de sódio

BF₃ - trifluoreto de boro

PC's - Polímeros Condutores

PANI - polianilina

EDGMA - Dimetacrilato de etilenoglicol

AIBN - 2,2'-azo-bis-isobutironitrila

NIP - Non Imprinted Polymer

K₃[Fe(CN)₆] - Ferricianeto de potássio

K₄[Fe(CN)₆] - Ferrocianeto de potássio

Sumário

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA	4
1.1 - Copaíba e métodos de padronização	4
1.2 - Sensores eletroquímicos	7
1.3 - Detecção dos marcadores químicos da copaíba.....	9
1.3.1 - Sensores eletroquímicos baseados em Polímeros Molecularmente Impressos (Molecularly Imprinted Polymer – MIP)	9
1.4- Detecção de adulterantes em copaíba.....	11
1.4.1 - Biossensores enzimáticos	11
1.4.2 - Sensores baseado em polianilina como elemento de reconhecimento.....	13
CAPÍTULO II - METODOLOGIA	18
2.1- Síntese química dos elementos de reconhecimento dos sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno	18
2.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura das camadas reconhecedoras do β -cariofileno e óxido de cariofileno, e do adulterante.....	19
2.3 - Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier das camadas reconhecedoras do β -cariofileno e óxido de cariofileno.....	19
2.4 - Análises Térmicas das camadas reconhecedoras do β -cariofileno e óxido de cariofileno.....	20
2.5 - Caracterização por espectroscopia Raman dos polímeros NIP e MIP's poli(ácido acrílico) para β -cariofileno.....	20
2.6 - Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) dos polímeros NIP e MIP's poli(ácido acrílico) para β -cariofileno.....	21
2.7 - Eletrodos modificados.....	21
2.7.1 – Fabricação dos eletrodos (Pasta de Carbono).....	21
2.7.2 – Preparo das pastas compósitos	22
2.8 - Caracterização eletroquímica dos elementos de reconhecimento poliméricos	22
2.8.1- Procedimento de análise dos padrões β -cariofileno e óxido de cariofileno	23
2.9 - Eletropolimezação da camada reconhedora do adulterante.....	23

2.9.1 - Procedimento de detecção do adulterante em óleo copaíba.....	24
2.9.2 - Procedimento de análise para obtenção das curvas de calibração do adulterante óleo de soja.....	25
CAPÍTULO III – SENSOR PARA β-CARIOFILENO	26
3.1 - Caracterização morfológica dos MIP's de β -cariofileno	26
3.2 - Caracterização térmica das camadas reconhecedoras do β -cariofileno.....	27
3.3 - Caracterização espectroscópica por Infravermelho com Transformada de Fourier.	29
3.3.1 - Caracterização β -cariofileno.....	30
3.3.2 - Caracterização espectroscópica por IV-TF das camadas reconhecedoras do β - cariofileno	31
3.3.3 - Caracterização da camada reconhedora derivada do monômero acrilamida ...	32
3.3.4 - Caracterização da camada reconhedora derivada do monômero ácido metacrílico	34
3.3.5 - Caracterização da camada reconhedora derivada do monômero ácido acrílico	36
3.4 - Caracterização por espectroscopia Raman dos NIP e MIP de poli(ácido acrílico)....	39
3.5 - Análises por XPS dos NIP e MIP de poli(ácido acrílico).....	41
3.6 - Caracterização eletroquímica do sensor para β -cariofileno	43
3.6.1 - Estudo do comportamento dos eletrodos modificados.....	43
3.6.2 - Detecção do β -cariofileno	44
3.6.3 - Teste de detecção de β -cariofileno em amostras de óleo de Copaíba	46
CAPÍTULO IV – SENSOR PARA ÓXIDO DE CARIOFILENO	48
4.1 - Caracterização morfológica dos MIP's de óxido de cariofileno	48
4.2 - Caracterização térmica das camadas reconhecedoras do óxido de cariofileno	49
4.3 - Caracterização espectroscópica por Infravermelho com Transformada de Fourier..	52
4.3.1 - Caracterização do óxido de cariofileno	52
4.3.2 - Caracterização espectroscópica por IV-TF das camadas reconhecedoras do óxido de cariofileno.....	54
4.3.3 - Caracterização da camada reconhedora derivada do monômero acrilamida.....	55
4.3.4 - Caracterização da camada reconhedora derivada do monômero ácido metacrílico	57
4.3.5 - Caracterização da camada reconhedora derivada do monômero ácido acrílico	59

4.4 - Caracterização eletroquímica do sensor para óxido de cariofileno.....	62
4.4.1 - Estudo do comportamento dos eletrodos modificados.....	62
4.4.2 - Detecção do óxido de cariofileno e curva de calibração.....	64
4.4.3 - Teste de detecção do óxido de cariofileno em amostra de Copaíba.....	66
CAPÍTULO V – SENSOR PARA O ADULTERANTE.....	68
5.1 - Estudos sobre detecção de adulterante.....	68
5.2 – Caracterização morfológica da PANI.....	68
5.3 - Estudos de caracterização eletroquímica da PANI.....	68
5.4 - Estudos sobre resposta eletroquímica do sensor para detecção de adulterante.....	74
5.5 - Detecção do adulterante.....	81
5.6 - Teste de detecção do adulterante em amostra de óleo de Copaíba.....	82
CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS.....	107

INTRODUÇÃO

A vasta extensão e diversidade biológica da região amazônica desperta grande interesse por parte da comunidade científica e das indústrias em relação à utilização para fins medicinais, cosmetológicos e alimentícios. Dentre as várias espécies endêmicas que apresentam substâncias biologicamente ativas, encontram-se as Copaifbas que compreende diversas espécies produtoras de óleorresinas que se caracterizam pela presença de uma importante classe de metabólitos especiais, os terpenos, responsáveis por diversas atividades (SIMÕES et al., 1999; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002).

O óleo *in natura* apresenta certa diversidade dos seus constituintes, e por ser um produto florestal primário, sua exploração pode apresentar algumas características originárias de seu manejo, ocasionando a mistura de óleos de diferentes espécies botânicas, falta de padronização do óleo-resina ou ainda problemas de falsificação e adulteração (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002; TAPPIN et al., 2004). Assim, a necessidade da aplicação de métodos simples e rápidos em pequenos estabelecimentos comerciais com poucos recursos laboratoriais, especialmente no caso de pequenas empresas que produzem para indústrias farmacêuticas e de cosméticos, se deparam com a perda significativa de valor agregado dos produtos devido à incapacidade de comprovar parâmetros de qualidades fundamentais (VASCONCELOS e GODINHO, 2002).

Em geral, o óleo de copaifba é qualificado em estruturas laboratoriais de elevado custo, distantes dos centros de coleta e que envolvem recursos humanos específicos. Neste sentido, dentre os vários estudos relacionados com o controle de qualidade e padronização desta importante matéria prima é destacada a técnica de cromatografia em fase gasosa que proporciona uma caracterização qualitativa e quantitativa quanto à presença de terpenos (VEIGA-JUNIOR et al., 1995; VEIGA-JUNIOR et al., 1997; TAPPIN et al., 2004).

A aplicação de sensores eletroquímicos para o controle e qualificação de óleos e extratos vegetais constitui uma importante ferramenta de análise que possibilita a comprovação das matérias primas e seus derivados com baixo custo, rapidez e eficiência (ANGNES et. al., 2000; CHAMBERS et al, 2008).

O presente trabalho de tese tem como objetivo o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para qualificação de óleos de Copaíba. Desta forma, sensores eletroquímicos foram desenvolvidos para a detecção do principal adulterante, o óleo de soja, assim como, a detecção de β -cariofileno e o óxido de cariofileno considerados marcadores químicos do óleo de copaíba.

OBJETIVOS

GERAL

- Desenvolver sensores eletroquímicos para qualificação do óleo-resina de copaíba através da detecção de adulterantes, e dos constituintes β -cariofileno e óxido de cariofileno.

ESPECÍFICOS

- Síntese dos elementos de reconhecimento baseados em polímeros molecularmente impressos (MIP's) para β -cariofileno;
- Síntese dos elementos de reconhecimento baseados em MIP's para óxido de cariofileno;
- Caracterização dos elementos de reconhecimento baseados em MIP's para β -cariofileno por espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier;
- Caracterização dos elementos de reconhecimento baseados em MIP's para óxido de cariofileno por espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier;
- Desenvolvimento e caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados de pasta de carbono;
- Desenvolvimento e caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados de pasta de carbono com os MIP's para a detecção de β -cariofileno;
- Desenvolvimento e caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados de pasta de carbono com os MIP's para a detecção de óxido de cariofileno;
- Síntese e caracterização eletroquímica do elemento de reconhecimento para os adulterantes encontrados em óleos de copaíba;

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

1.1 - COPAÍBA E MÉTODOS DE PADRONIZAÇÃO

O óleo resina de copaíba é utilizado desde a época da chegada dos portugueses ao Brasil na medicina popular e indicam uma gama de variedade de propriedades farmacológicas, e silvícola para diversas finalidades (COELHO-FERREIRA, 2009; IZUMI et. al., 2012).

É um Produto Florestal Não Madeireiro (PFNM), ou seja, que pode ser coletado em áreas florestais nativas, ou por intermédio de plantações florestais e de árvores isoladas (FAO 1995). Na Amazônia, os PFNM, são cada vez mais utilizados como matéria-prima destinada à produção dos chamados bioprodutos, que são desenvolvidos a partir de organismos vivos e/ou partes constituintes destes que podem substituir ou elevar a produção de produtos de fontes não renováveis.

A indústria farmacêutica e de cosmético utiliza o óleo resina por suas propriedades emolientes, bactericida e anti-inflamatório, na manufatura de sabonetes, cremes e espumas de banho, xampus, cremes condicionadores, loções hidratantes e capilares. (FERNANDES & FREITAS, 2007; LIMA et. al., 2011).

A demanda pelo uso de produtos fitoterápicos vem aumentando por grande parte da população brasileira, porém, o controle de qualidade sobre os produtos, principalmente do óleo de copaíba, não tem aumentado no mesmo ritmo do consumo que nos bioprodutos.

Produtos cosméticos ou fitoterápicos que são derivados de plantas, passam por um processo de secagem para que sejam extraídos os princípios ativos. No caso de óleos o problema é ainda mais grave, podendo sofrer transformações químicas durante o armazenamento, ou serem adulterados com outros óleos inclusive de espécies afins (VEIGA JÚNIOR et al., 1997).

Os óleos de copaíba apresentam grande variação em sua composição química, e o fator que implica nessa maior complexidade da sua composição, são as misturas dos óleos com diferentes espécies botânicas.

Para tentar solucionar estas dificuldades, várias metodologias já foram relatadas na literatura (BARBOSA et al., 2004; BIAVATTI et. al., 2006) utilizando como critério de autenticidade do óleo de copaíba, como técnicas físico-químicas, analisando a densidade e viscosidade dos óleos, e não chegando a um resultado satisfatório (SILVA et al., 2012).

De maneira semelhante, a solubilidade dos óleos em álcool absoluto tem sido empregada para indicar a ausência de adulteração do óleo de copaíba por óleos graxos, e um método titulométrico simples para padronização do óleo de copaíba, também foram propostos, sendo obtido valores limites de detecção dos índices de acidez e éster nos óleos de copaíba estudados. Porém, a técnica ainda precisa ser aprimorada em função de um estudo mais abrangente envolvendo outras espécies do gênero *Copaifera* (VASCONCELOS & GODINHO 2002).

Outro procedimento estudado foi repostado por Barbosa et. al., (2009) que utiliza as técnicas de índice de refração e cromatografia de camada delgada (CCD). Segundo os autores, a técnica desenvolvida para detectar adulteração no óleo resina foi eficiente, rápida e de baixo custo, porém, sabe-se que a CCD é uma técnica que pode apresentar dificuldade na sua reprodutibilidade e determinação exata do fator de retenção.

Veiga-Junior et al., (1997) realizaram um estudo sobre controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais, desenvolvendo uma metodologia que utiliza a técnica de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM). Nos dezesseis óleos comerciais estudados foram detectados a presença de ácidos carboxílicos lineares, sendo um forte indicativo de adulteração por óleo de soja.

Entre as técnicas mais utilizadas por diversos autores e que apresenta maior robustez, eficiência e reprodutibilidade pode ser citada a cromatografia em fase gasosa. BARBOSA et al., (2004) utilizaram a cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de ionização em chama para quantificar diterpenos e sesquiterpenos como padrões externos. Neste trabalho foi observado a variação desses constituintes nos óleos coletados em diferentes árvores, mas condições semelhantes de solos.

Veiga-Junior & Pinto (2005) estudaram a presença de marcadores biológicos e adulterantes em óleos de copaíba comerciais adquiridos no Rio de Janeiro. Foram aplicadas as técnicas de CG-EM para o monitoramento seletivo e simultâneo dos íons dos marcadores e dos adulterantes. Igualmente foram detectados através da detecção de fragmentos específicos de hidrocarbonetos e ésteres metílicos de ácidos graxos lineares saturados e insaturados.

Uma característica importante observada nos óleos de copaíba é a ausência de óleos graxos em sua composição. Na composição química dos óleos resinas de copaíba é relatada apenas a presença de sesquiterpenos e diterpenos, que podem apresentar variação por diversos fatores bióticos e abióticos (BRAGA et. al., 1998; VEIGA-JUNIOR & PINTO 2005; LEANDRO et. al., 2012; BARBOSA et. al., 2012).

Verifica-se nestes trabalhos que envolvem técnicas de cromatografia em fase gasosa, que a medida experimental é a etapa mais importante para a identificação dos constituintes presentes nos óleos de copaíba, sem desconsiderar também o processo de preparo das amostras, pois pode ocasionar alteração do resultado.

Nos óleos de copaíba são substâncias ácidas, dessa forma é necessária a utilização de métodos de derivatização e esterificação para sua identificação através da técnica de cromatografia em fase gasosa (VEIGA-JUNIOR et al., 1997; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002; TAPPIN et al., 2004; BIAVATTI et. al., 2006).

Essas análises são realizadas por dois métodos por duas vias catalíticas, a básica e a ácida, sendo métodos relativamente rápidos e podendo ser realizados a temperatura ambiente. Dentre os vários reagentes utilizados, o largamente utilizado é BF_3 em metanol, que é extremamente tóxico (CETINKAYA & KARAOSMANOGLU, 2004; MEHER *et al.*, 2006; MILINSK *et al.*, 2008)

Visto que para análise por cromatografia gasosa dos óleos de copaíba, há necessidade da utilização de reagentes tóxicos, e correndo sério risco de explosão durante sua preparação associada as condições agressivas empregadas, caracterizando desvantagens importantes da reação para sua adoção na rotina analítica, necessita-se de novas técnicas de análise em substituição a essas empregadas atualmente para o controle de qualidade dos respectivos óleos.

1.2 - SENSORES ELETROQUÍMICOS

O sensor é um dispositivo que responde a um analito particular, de maneira seletiva, por meio de uma reação química, sendo utilizado para análises qualitativas e quantitativas. Estes dispositivos permitem a coleta de dados e obtenção de informações com manipulação mínima do sistema estudado, através de uma reposta eletroquímica de um sinal mensurável para detecção de analitos-alvo. De forma geral, o sensor eletroquímico funciona a partir da especificidade e alta sensibilidade do analito-alvo com a camada receptora (WANG, 2000), como pode ser observado na Figura 1.

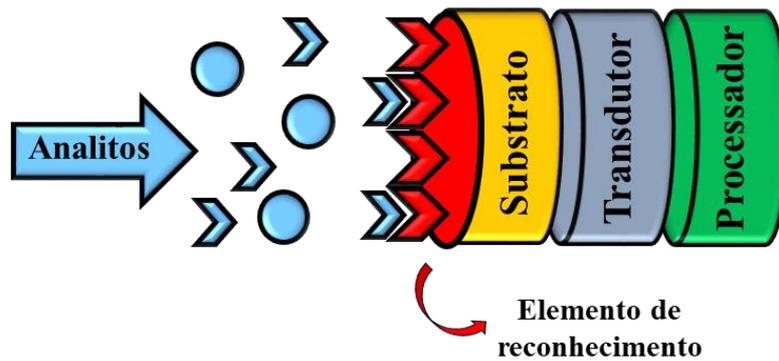


Figura 1: Configuração de um sensor eletroquímico, mostrando a organização dos seus componentes funcionais.

O uso destes dispositivos eletroquímicos tem aumentado por serem ferramentas promissoras para substituição das técnicas existentes, devido às suas características singulares: alta seletividade, baixo custo de construção, potencial miniaturização e construção de equipamentos simples e portáteis (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002; LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006).

A parte fundamental do sensor é o elemento de reconhecimento, usualmente posicionado na extremidade do dispositivo, onde ocorre a interação do analito com o componente biológico ou membrana, produzindo um sinal elétrico. E esta camada receptora pode ser uma enzima, anticorpo, ácido nucléico, polímero entre outros (PATHAK et al, 2007; CHAMBERS et al, 2008; LEE et al, 2008).

A escolha da camada receptora deve seguir requisitos básicos, como disponibilidade de um sítio reativo que possa reagir/interação com o analito, estabilidade face ao meio e as condições de medição e possibilidade de modificação/ imobilização sobre suporte por método químico sem afetar o seu desempenho (SALGADO, 2001).

1.3 DETECÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS DA COPAÍBA

1.3.1 SENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER – MIP)

O primeiro relato do uso de polímeros impressos como elemento de reconhecimento, foi como sensor de capacitância, nos estudos realizados por Mosbach, em 1991. Em seguida, vários trabalhos aplicando *MIP's* em sensores químicos foram realizados (HEDBORG et al., 1993; HAUPT & MOSBACH, 1999). Blanco-Lopez et al., (2002) investigaram o desenvolvimento do sensor voltamétrico para ácido vanilmandélico, baseado em eletrodos modificados com MIP-acrílico.

Polímeros com impressão molecular tem atraído grande interesse para o desenvolvimento de sistemas de reconhecimento molecular altamente específico (KHADRO et al., 2010). Além disso, apresenta excepcional estabilidade química e térmica, capacidade de adsorção, facilmente sintetizáveis, podendo ser moldados de acordo com sua utilização e boa reprodutibilidade no preparo (FERRER et al., 2000).

Por apresentarem essas características, os *MIP's* são amplamente utilizados em várias áreas da química, como no processo de separação cromatográfica, eletroforese capilar, extração e microextração em fase sólida para melhorar a seletividade e selecionar espécies químicas com estruturas similares ou pertencentes à mesma família de compostos (NILSSON et al., 1997; ANDERSSON, 2000; KOSTER et al., 2001; HWANG & LEE, 2002).

Sua síntese é realizada na maioria das vezes com a mistura de um monômero funcional com o analito de interesse, que serve de molde para as cavidades tridimensionais que serão impressas no polímero. Em seguida, é utilizado um reagente de

ligação cruzada e um iniciador radicalar para estabilizar as ligações e iniciar o processo de polimerização (HAUPT, 2001), podendo ser observada na Figura 2. E quando a síntese é realizada sem a presença da molécula molde, o polímero é definido como NIP (Non Imprinted Polymer).

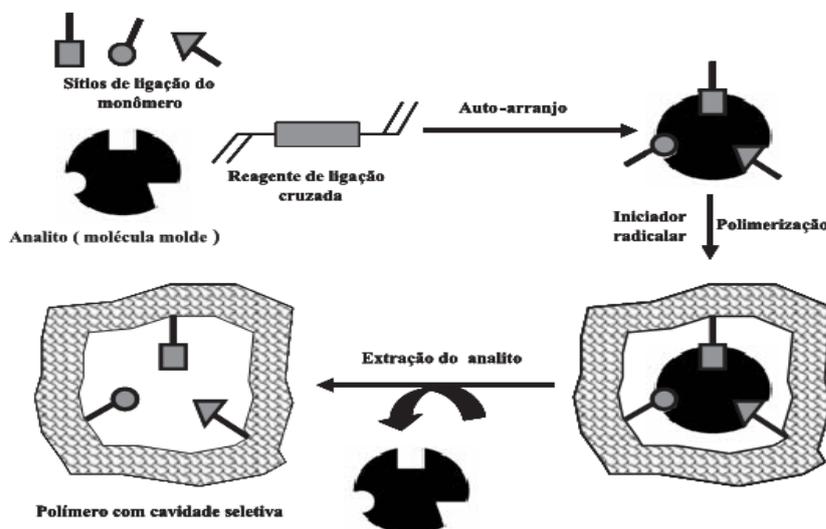


Figura 2: Representação esquemática da síntese dos *MIP's* (TARLEY et. al., 2005).

Um fator de extrema importância para a síntese dos *MIP's* é a escolha da molécula a ser utilizada como molde e o monômero a ser empregado. Pois a interação analito-monômero pode ser realizada por ligação hidrogênio, interação dipolo-dipolo, ligação covalente ou não covalente (AL-KINDY et al., 2000).

Outra questão relevante é que a molécula molde não pode ser polimerizável, pois poderá reagir com o monômero funcional, e dependendo das condições em que ocorre a polimerização deverá ser estável ao aquecimento e/ou radiação UV (CORMACK & ELORZA, 2004).

Essas condições foram determinantes para o desenvolvimento do dispositivo eletroquímico para a detecção do constituinte óxido de cariofileno (Figura 3). Pois sua molécula precursora, β -cariofileno (Figura 3), apresenta em sua estrutura duas duplas ligações distintas, sendo que uma delas faz parte do anel de 9 membros e é ativada pela

metila e a outra é exocíclica. Dessa forma, fazem com que elas apresentem reatividades diferenciadas com relação a diversos reagentes, incluindo agentes oxidantes.

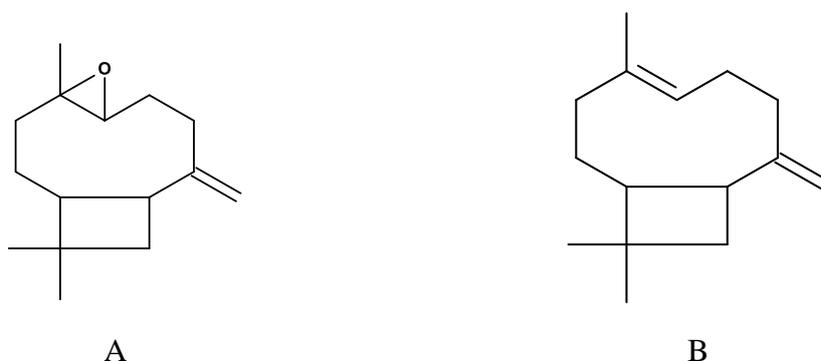


Figura 3: Estrutura dos sesquiterpenos A) óxido de cariofileno; B) β -cariofileno

E até o presente momento não há relatos na literatura de polímeros impressos utilizando os sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno.

Portanto, nesta tese foram sintetizados os polímeros molecularmente impressos a partir de três diferentes monômeros funcionais acrilamida, ácido acrílico e ácido metacrílico (Figura 4).

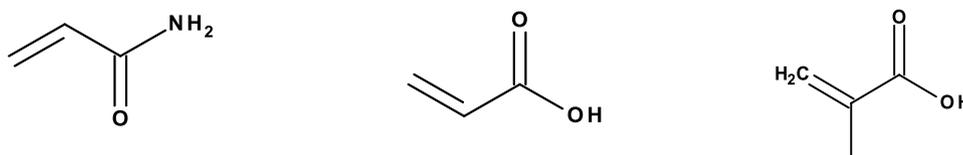


Figura 4: Monômeros acrilamida, ácido acrílico e ácido metacrílico, respectivamente.

1.4 DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM COPAÍBA

1.4.1 BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS

Como foi descrito anteriormente, um dos principais adulterantes encontrado nos óleos de copaíba é o óleo de soja. Na literatura, são relatados dispositivos eletroquímicos que utilizam enzimas como camada reconhecedora para detecção óleos graxos. E um

grupo de enzimas muito utilizadas são as lipases que apresentam a capacidade de catalisar a hidrólise total ou parcial de triglicerídeos de cadeias longas.

Rejeb et. al., (2007) estudaram a detecção de triacilgliceróis através da atividade catalítica da lipase M de *Mucor javanicus*, como biossensor enzimático amperométrico baseado em glicerol desidrogenase com NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) oxidase. Para a determinação do triglicerídeo tributirina, Solanki et. al., (2015) imobilizaram a lipase oriunda de *Aspergillus oryzae* e a enzima glicerol desidrogenase, em um biossensor amperométrico baseado em nanocompósito preparado a partir de nanopartículas de quitosana e óxido de zircônio.

Diversos trabalhos relatam também o uso da lipase *candida rugosa* em biossensores para a detecção de triglicerídeos. Kartal et. al., (2007) desenvolveram um biossensor potenciométrico para a determinação do triglicerídeo tributirina, imobilizando a lipase *candida rugosa* em um eletrodo de vidro por meio da membrana gelatinosa glutaraldeído. Em um trabalho recente, nanopartículas da lipase *candida rugosa* foram imobilizadas em eletrodo de grafite para a detecção do triacilglicerol trioleína (NARWAL & PUNDIR, 2017). Na detecção de triglicerídeo em óleo de azeite de oliva, a lipase *candida rugosa* junto ao líquido iônico 1-(2-etoxietil)-1-metilpirrolidínio bis(trifluormetilsulfonil)imida foi imobilizada em eletrodo de carbono impresso, devido à alta condutividade iônica e boa biocompatibilidade para aumentar a resposta eletroquímica (ROSLI et. al., 2017).

O funcionamento desses biossensores ocorre em função do processo de hidrólise enzimática exercida pelas lipases com os triglicerídeos. Essas reações biocatalíticas devem ocorrer na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, a nível da interface lipídeo/água, dessa forma, as lipases ficam ativas para a realizar as catalises (PINHEIRO et. al., 2008; PIMENTEL et. al., 2009; COSTA et. al., 1999).

De maneira geral, o processo de detecção dos triglicerídeos ocorre com a hidrólise do triglicerídeo em glicerol e ácidos graxos na presença da lipase, e em seguida é realizada a determinação quantitativa do glicerol liberado, nesse caso, usando a enzima glicerol desidrogenase, que oxida o glicerol resultando em NADH em um a solução contendo NAD⁺. Após, o NADH pode ser diretamente oxidado em um eletrodo convencional. Porém, para que isso ocorra é necessário o uso de um potencial elevado, devido à transferência de carga cinética ser lenta (LAURINAVICIUS et. al., 1996; LIAO et. al., 2008).

Outra adversidade em relação ao uso de lipases é a sua imobilização no substrato do dispositivo eletroquímico. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (SOARES et, al., 1999). Na literatura, vários métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (VILLENEUVE et. al., 2000; BALCÃO et. al., 2000; BRUNO et. al., 2004). Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras poder ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil (FABER, 2000).

1.4.2 SENSORES BASEADO EM POLIANILINA COMO ELEMENTO DE RECONHECIMENTO

A partir da problemática encontrada com os biossensores enzimáticos, e na busca por uma nova forma de detecção com menos etapas, imobilização mais simples e economicamente viável, foi proposto o desenvolvimento de um dispositivo eletroquímico de detecção utilizando como camada reconhecedora o polímero condutor polianilina.

A polianilina, conhecida como PANI, foi inicialmente descoberta em 1834 por Runge, mas sendo descrita na literatura somente em 1862 por Letheby, e desde então, tem sido muito utilizada pela sua estabilidade química condições ambientais, baixo custo, facilidade de polimerização e dopagem (LETHEBY, 1862; GREEN & WOODHEAD, 1912; SANCHES et. al., 2013). Além disso, descobriu-se que a PANI apresentava características de mudança entre um condutor e um isolador sob certas condições experimentais.

A PANI é dada por uma fórmula geral, representada na Figura 5, cuja composição química na forma não dopada (forma básica), pode ser encontrada em diferentes estados de oxidação que consistem na alternância de unidades repetitivas das formas reduzidas (Y) e oxidada (1-Y).

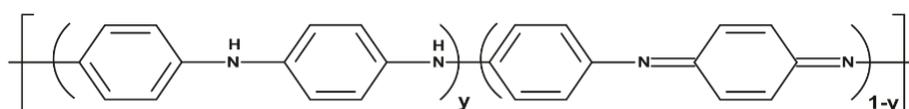


Figura 5: Estrutura da PANI

Na Figura 6 são apresentados os estados de oxidação da PANI, leucoesmeraldina, protoesmeraldina, esmeraldina, nigranilina e pernigranilina, quando Y for igual a 1; 0,75; 0,5; 0,25 e 0, respectivamente. Apesar de serem estruturalmente semelhantes, mas com diferentes estados de oxidação, apresentam comportamento óptico e eletrônico bastante distintos.

A PANI pode ser sintetizada através de dopagem via reações de oxidação e redução como os demais polímeros condutores, como foi relatado anteriormente. Porém, a dopagem na PANI pode acontecer sem provocar alteração na quantidade de elétrons associados à cadeia polimérica, diferentemente da dopagem redox (EPSTEIN et. al., 1987).

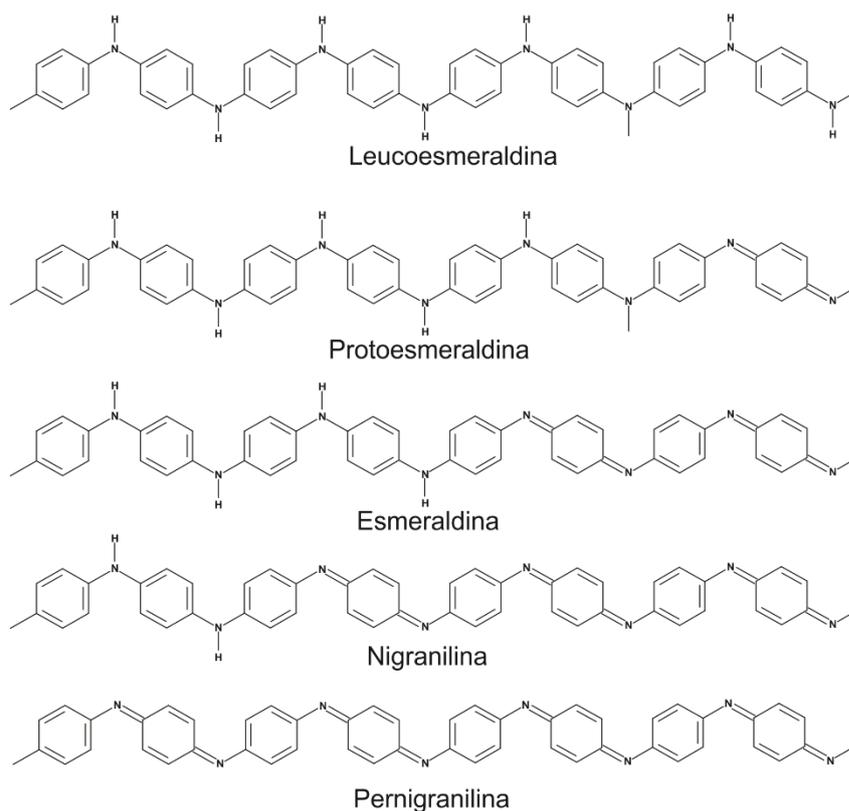


Figura 6: Estados de oxidação da PANI.

Este processo de síntese ocorre via eletroquímica e tem sido bastante estudada para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos (BIÑA & SEVILLA, 2003; SAMBASEVAM et. al., 2015). A eletropolimerização apresenta como vantagens a possibilidade do controle de parâmetros de síntese, tal como da espessura do filme polimérico, reprodutibilidade dos filmes, ser um procedimento simples, rápido e fácil, diferentemente de outros monômeros (RODRÍGUEZ et al., 1977).

A dopagem da PANI no estado base esmeraldina pode ser feita por protonação dos nitrogênios iminícos em solução aquosa de ácidos protônicos fortes (HCl, H₂SO₄, HNO₃, HClO₄, CF₃COOH), necessitando a incorporação de contra-íons (dopante) para neutralizar as cargas excedentes, e a formação de segmentos semiquinônicos (radicais cátions) ocorre através de uma reação redox interna (MACDIARMID & EPSTEIN, 1989; GENIES & BOYLE, 1990). Esta é a forma estrutural onde a PANI alcança os maiores

valores de condutividade. E a desprotonação ocorre reversivelmente por tratamento semelhante com solução aquosa básica (NH_4OH) (MATTOSO & MACDIARMID 1996).

O mecanismo de dopagem protônica da base esmeraldina, os tipos de segmentos e o esquema de interconversão das diferentes formas da PANI estão apresentadas na Figura 7.

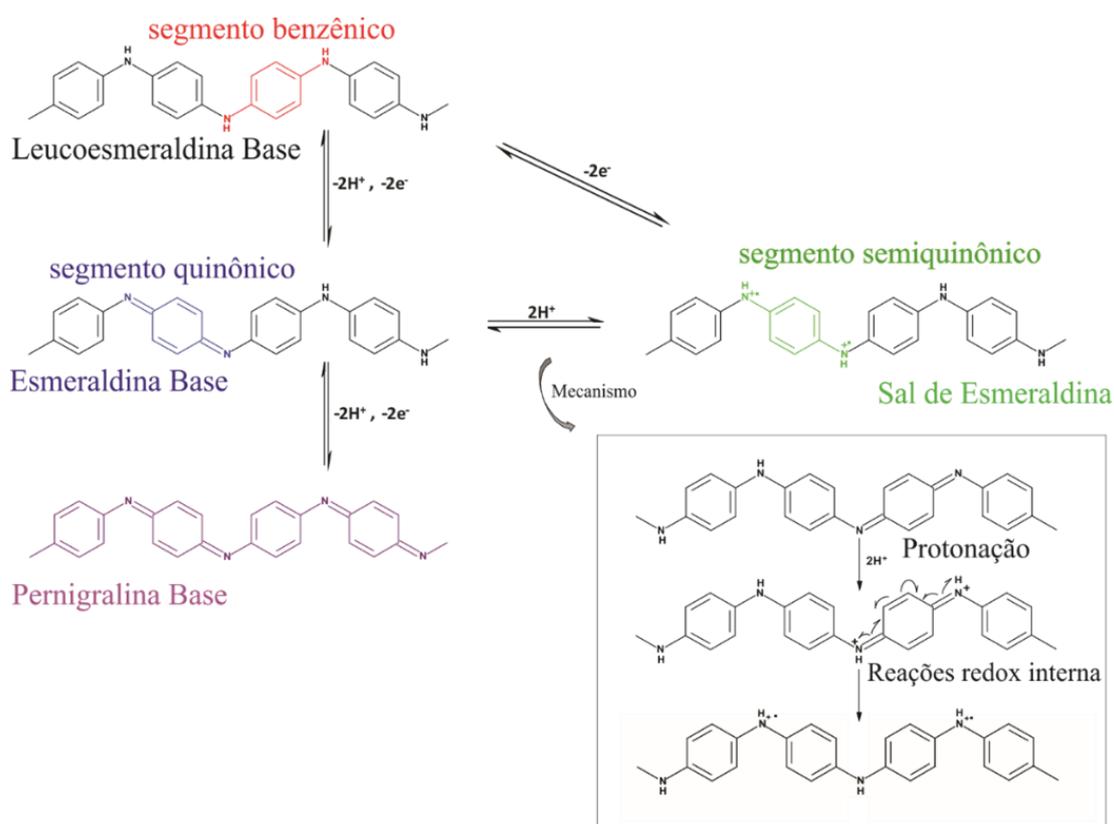


Figura 7: Esquema da interconversão dos estados de oxidação da PANI e o mecanismo de dopagem protônica (IZUMI, 2006).

Essa forma protonada da PANI pode realizar o fenômeno de troca iônica, que consiste em um processo onde um íon negativo presente em fase aquosa é capturado sobre a superfície de um trocador iônico, realizando um processo de compensação de cargas (VARELA, et. al., 2002; ZORNITTA et. al., 2014).

Devido a esse fenômeno, de apresentar sua estrutura positivamente carregada, a PANI foi utilizada, em estudos de sensores eletroquímicos para controle de glicose, no processo de adsorção por interação eletrostática da enzima GOx, que apresenta carga

negativa a valor de pH maior que seu ponto isoelétrico (YAN et. al., 2008; HORNG et. al., 2009). E Dhand et. al., (2010), imobilizaram covalentemente a enzima GOx em uma matriz nanoestruturada de PANI com auxílio de EDC-NHS.

Até o momento não foram encontrados na literatura, estudos relacionados a sensores eletroquímicos utilizando PANI para detecção de óleos graxos, como a soja. Sabe-se que quando óleos graxos reagem com soluções de NaOH, ocorre a saponificação dessas substâncias, e como resultado há formação de estruturas carregadas negativamente, e sabendo que quando a PANI é sintetizada no seu estado protonado ocorre o fenômeno de compensação de cargas, foi realizado o desenvolvimento de sensores eletroquímicos utilizando PANI no estado de oxidação sal esmeraldina, como camada reconhecedora, para a detecção de óleos graxos saponificados.

CAPÍTULO II - METODOLOGIA

A seguir, são descritos os procedimentos empregados na síntese dos polímeros molecularmente impressos, utilizados como elementos de reconhecimento dos constituintes β -cariofileno e óxido de cariofileno, assim como as técnicas de caracterização espectroscópicas e morfológicas. Posteriormente, esses polímeros foram utilizados em mistura compósita de pasta de carbono na fabricação dos eletrodos modificados, para serem realizados caracterizações e detecções eletroquímicas das moléculas alvo.

Após, foi realizada a síntese eletroquímica do elemento de reconhecimento do adulterante encontrado no óleo de copaíba. Foi realizada caracterização morfológica e eletroquímica deste elemento de reconhecimento, a PANI. Em seguida, foram realizados estudos eletroquímicos dos eletrodos de ouro funcionalizados com PANI, com óleos de copaíba puro e adulterado.

2.1 - Síntese química dos elementos de reconhecimento dos sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno

A síntese foi realizada seguindo o procedimento de Pardeshi et al, (2012), como é mostrado na Figura 8.

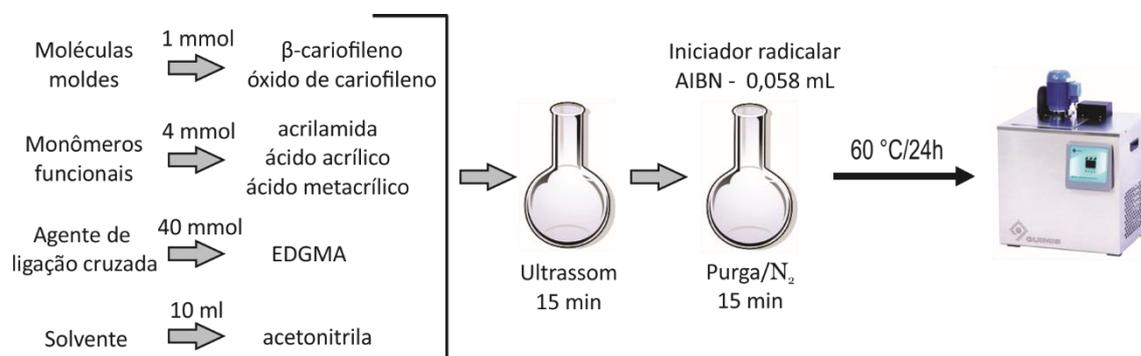


Figura 8: Esquema de síntese dos MIP's com seus respectivos monômeros e moléculas moldes.

Após adicionar os reagentes no frasco, esse foi levado ao ultrassom por 15 minutos, posteriormente, adicionado 0,058 mL do iniciador radicalar, 2,2'-Azo-bis-isobutironitrila, AIBN, e a amostra foi purgada com nitrogênio por 15 minutos, para retirada de oxigênio. Em seguida, o balão selado com filme plástico, foi colocado em banho termostático a 60 °C por 24 horas até sua polimerização.

2.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura dos elementos de reconhecimento do β -cariofileno e do óxido de cariofileno e do adulterante

Realizou-se a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar as características morfológicas das partículas e suas respectivas superfícies dos MIPs, como também dos NIPs. As morfologias dos polímeros foram avaliadas a partir da MEV usando o microscópio de varredura eletrônica (modelo LEO – 435 VP, Zeiss, Oberkochen, Germany) com voltagem de aceleração de 30 kV. Para realização desta análise as amostras foram montadas em suportes de alumínio "stubs", com o auxílio de fita adesiva de carbono dupla face. Em seguida foram cobertos com ouro e observados em MEV.

2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier dos elementos de reconhecimento do β -cariofileno e óxido de cariofileno

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos por meio de um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier modelo Nicolet IR 200, operando no modo de transmissão entre 4000 e 400 cm^{-1} . Cada amostra foi misturada com KBr na proporção 1:100 e prensada em disco na pressão 80 KN por 2 min.

Os MIP's derivados dos monômeros acrilamida, ácido acrílico e ácido metacrílico das respectivas moléculas moldes, β -cariofileno e óxido de cariofileno, foram macerados

e uma porção de cada polímero foi lavado com metanol em ultrasson por 15 minutos, e este procedimento foi repetido 3 vezes, para que o polímero se torne depois da extração, que é a extração da molécula modelo da estrutura tridimensional do polímero. Assim, a estrutura do MIP torna-se desenhada na forma da estrutura do analito, portanto, ativada para a detecção do analito. Outra porção dos polímeros foi apenas macerada, não sendo realizada a extração da molécula molde, dessa forma considerada como não ativada, pois está com o analito na estrutura.

2.4 Análises Térmicas dos elementos de reconhecimento do β -cariofileno e óxido de cariofileno

As análises de Termogravimetria (TGA) foram realizadas em um SDT Q600 da Ta Instrument, localizado no laboratório de Ensaios Físico-Químicos/FT/UFAM. Todas as amostras foram aferidas a aproximadamente 10 mg, a taxa de aquecimento foi de 10 °C/min até a temperatura final de 600°C, com fluxo de gás N 5.0 de 30 ml/min. O cadinho utilizado nos testes foi o de alumina de 90 microlitros sem tampa.

O procedimento de extração das moléculas moldes, β -cariofileno e óxido de cariofileno, realizado para a análise de IV-TF, também foi realizado nas análises térmicas.

2.5 Caracterização por espectroscopia Raman dos polímeros NIP e MIP's poli(ácido acrílico) para β -cariofileno

Os espectros de modo vibracional ativo foram coletados usando um microscópio Confocal Raman (WITec alfa 300R, WITec GmbH, Ulm, Alemanha) equipado com um CCD refrigerado usando lente de ampliação de 50x e grade de 600 gmm^{-1} com o tempo de integração de 1s e 10 acumulações. As amostras foram excitadas usando um laser azul

(comprimento de onda 488 nm, potência a 20 mW). Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente na faixa espectral de 100 - 3600 cm^{-1} .

2.6 Espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS) dos polímeros NIP e MIP's poli(ácido acrílico) para β -cariofileno

As medidas de XPS foram realizadas no espectrômetro ESCALAB 250Xi (Thermo Scientific) equipado com um analisador hemisférico de energia de elétrons através da fonte de excitação de Al $K\alpha$ line ($h\nu = 1486.6$ eV). Os espectros foram calibrados através da energia do sinal C1s de átomos de C alifáticos na energia de ligação de 285.00 eV. Os espectros de XPS foram coletados usando de feixe de raios X com abertura de 650 μm com um ângulo de incidência de 90° em relação à superfície da amostra. A amostra foi colocada em fita condutiva de carbono de dupla face e os espectros foram coletados em dois pontos diferentes da amostra. Espectros de alta resolução foram adquiridos com resolução de energia de 25 eV nos níveis centrais de C1s e O1s.

2.7 Eletrodos modificados

2.7.1 Fabricação dos eletrodos (Pasta de Carbono)

Como suporte para o eletrodo, utilizou-se seringa plástica com altura de 5 cm e 3 mm de diâmetro, um disco de grafite de 3 mm de altura e 3 mm de diâmetro foi introduzido na seringa onde é funcionalizado com pasta de carbono modificada. Um fio de cobre fixado ao disco de grafite com uma mistura de resina epóxi bi-componente (Araldite®) e negro de fumo, criando uma base polimérica condutora. Na Figura 9 é mostrado o diagrama de fabricação dos eletrodos modificados de carbono.



Figura 9: Esquema de preparação do eletrodo modificado com MIP.

2.7.2 Preparo das pastas compósitas com elementos de reconhecimento poliméricos

Foram produzidas duas pastas compósitas: pasta de carbono com adição de NIP e pasta de carbono com adição de MIP depois da extração.

Para a produção da pasta de carbono, utilizou-se de negro de fumo e a resina epóxi bi-componente, na proporção 1:4, e uma pequena quantidade de ciclohexanona para melhorar a homogeneização da mistura.

Para as pastas de carbono com adição de NIP e MIP, foram utilizados negro de fumo, araldite® e NIP/MIP (macerados), na proporção 1:4:1. E uma pequena quantidade de ciclohexanona para melhorar a homogeneização da mistura.

2.8 Caracterização eletroquímica dos elementos de reconhecimento poliméricos

As medidas eletroquímicas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato AUTOLAB® PGSTAT 204 (Metrohm Autolab) interfaciado com o programa computacional NOVA 2.1.

Após a fabricação dos eletrodos modificados foi realizada a caracterização eletroquímica. Utilizou-se uma célula eletroquímica composta por um contra-eletródo de platina, eletrodo de referência Ag/AgCl e o eletrodo de trabalho (eletrodo modificado).

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando a técnica de voltametria cíclica com os potenciais entre -1 V e 1 V, velocidade de varredura de 25 mV, em 5 mL de solução 5 mmol. L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆]/ K₄[Fe(CN)₆] e KCl 0,2 mol. L⁻¹.

2.8.1 Procedimento de análise para obtenção das curvas de calibração dos padrões de β-cariofileno e óxido de cariofileno

Para a realização dessa análise, o eletrodo MIP depois da extração foi imerso em 5 mL da solução padrão de β-cariofileno/óxido de cariofileno, em diferentes concentrações, por cinco minutos, e em seguida o eletrodo foi imerso por dez segundos no solvente metanol, para retirar o excesso de material que possa ter ficado retido nas margens do eletrodo.

Após, foram realizadas as medidas eletroquímicas utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) com os potenciais entre -0,2 V e 0,8 V, *step potential* (0,005 V), frequência (25 Hz) e amplitude (0,02 V), em 5 mL de solução 5 mmol. L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆]/ K₄[Fe(CN)₆] e KCl 0,2 mol. L⁻¹.

2.9 Eletropolimerização da camada reconhecedora do adulterante

Em balão volumétrico de 250mL foi adicionada água deionizada até aproximadamente 1/3 (um terço) do volume, em seguida foram adicionados 24,23 ml de ácido nítrico concentrado. Após homogeneização e resfriamento, foram adicionados ao balão 1,17 ml de anilina 99,5%, então o volume do balão foi completado com água deionizada. A solução resultante tinha 0,05 Molar de anilina e 1 molar de ácido nítrico.

Sendo a anilina o monômero, o ácido nítrico atuando como eletrólito e como catalizador ácido em uma das várias etapas do mecanismo de polimerização.

A eletropolimerização foi realizada pela técnica de voltametria cíclica com auxílio do potenciostato AUTOLAB® PGSTAT 204 (Metrohm Autolab) interfaciado com o programa computacional NOVA 2.1.

Utilizou-se uma célula eletroquímica composta por um contra-eletrodo de platina, eletrodo de referência Ag/AgCl e o eletrodo de trabalho (eletrodo PANI).

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando a técnica de voltametria cíclica com os potenciais entre -0,2 V e 1V, velocidade de varredura de 100mV/s, em solução ácido de anilina.

2.9.1 Procedimento de detecção do adulterante em óleo copaíba

Para a detecção do óleo de soja (adulterante) foram utilizados eletrodos comerciais Screen Printed de ouro, adquiridos da empresa DropSens. Estes eletrodos foram funcionalizados com PANI.

Primeiramente, o eletrodo funcionalizado com PANI foi imergido em um frasco de 20 ml que continha 10 ml de solução de NaOH (hidróxido de sódio) 5 mol/L, e foi realizado a medida voltamétrica obtendo-se o perfil eletrolítico.

Após, em outro frasco contendo também 10 mL de NaOH 5 mol/L, foram adicionados 10 µL de óleo de soja, e deixou-se a mistura por cinco minutos sob agitação e em velocidade média, no agitador magnético. Em seguida colocou-se o eletrodo funcionalizado com PANI na mistura, e realizou-se a análise eletroquímica com os potenciais entre -0,6 V e 0,4 V e velocidade de varredura de 100mV/s.

Este procedimento foi repetido para a análise com óleo de soja, copaíba e com a copaíba adulterada, como é mostrado no esquema (Figura 10) abaixo.

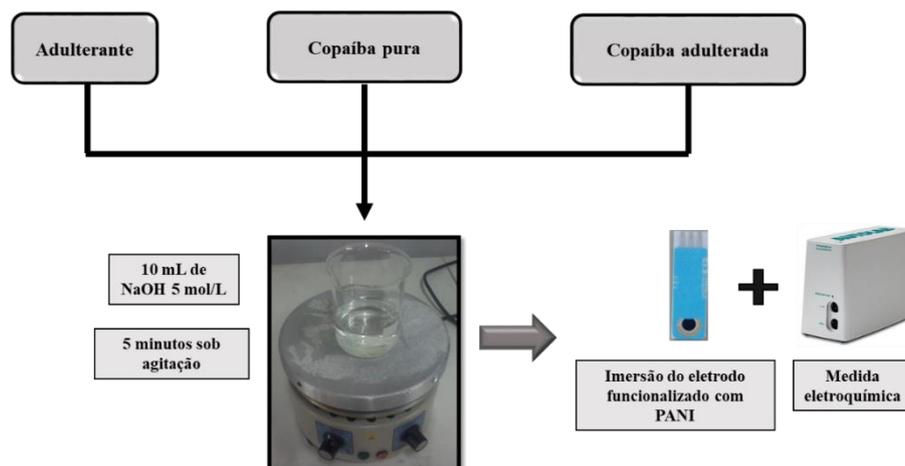


Figura 10: Esquema do procedimento de análise dos óleos utilizando o eletrodo funcionalizado com PANI.

2.9.2 Procedimento de análise para obtenção das curvas de calibração do adulterante óleo de soja

Para a realização dessa análise, foram preparadas quatro soluções de NaOH 5 mol/L, com diferentes concentrações do adulterante óleo de soja, e deixou-se a mistura por cinco minutos sob agitação em velocidade média, no agitador magnético. Em seguida, para cada solução, foi imergido um eletrodo PANI, e realizada as medidas eletroquímicas utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada com os potenciais entre 0,4 V e -0,6 V, *step potential* (-0,005 V), frequência (10 Hz) e amplitude (0,02 V).

CAPÍTULO III – SENSOR PARA β -CARIOFILENO

3.1 Caracterização morfológica dos MIP's de β -cariofileno

Os MIP's estudados no presente trabalho, foram sintetizados utilizando a técnica de bulk, no qual os reagentes são dissolvidos em solvente porogênico, e posteriormente polimerizado termicamente. Nas Figuras 11 e 12 são observadas as micrografias para os NIP's e MIP's após a extração da molécula molde.

Observa-se nas imagens referentes aos NIP's que elas apresentaram superfícies lisas e contínuas com um crescimento de grãos incipientes e estruturas não porosas. Em relação as imagens dos MIP's, são observados grãos bem definidos e de um tamanho médio de 100 nm, apresentando uma morfologia estrutural irregular e porosa, típica de polímeros molecularmente impressos após a extração da molécula molde (FÉAS et al., 2009).

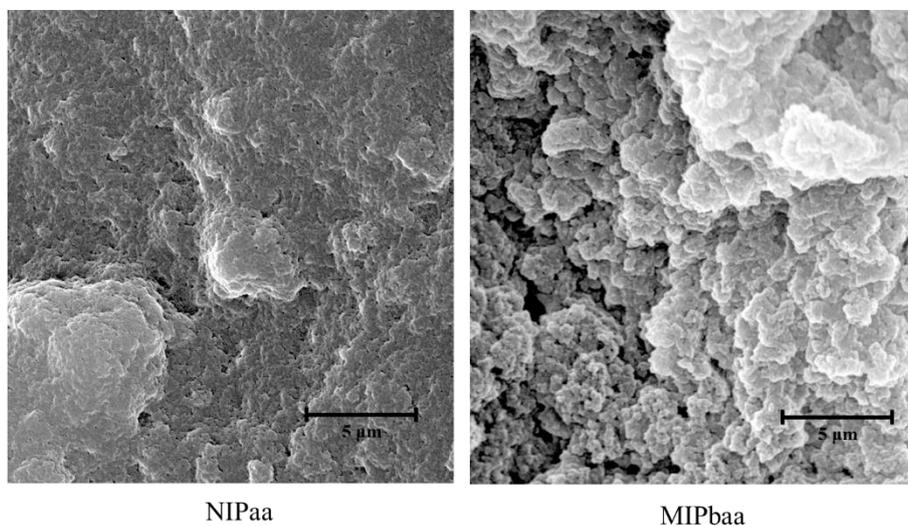


Figura 11: Imagens de microscopia de varredura eletrônica dos MIP's e NIP's. Legenda: aa – ácido acrílico; b - β -cariofileno; (aumento de 22.000 vezes).

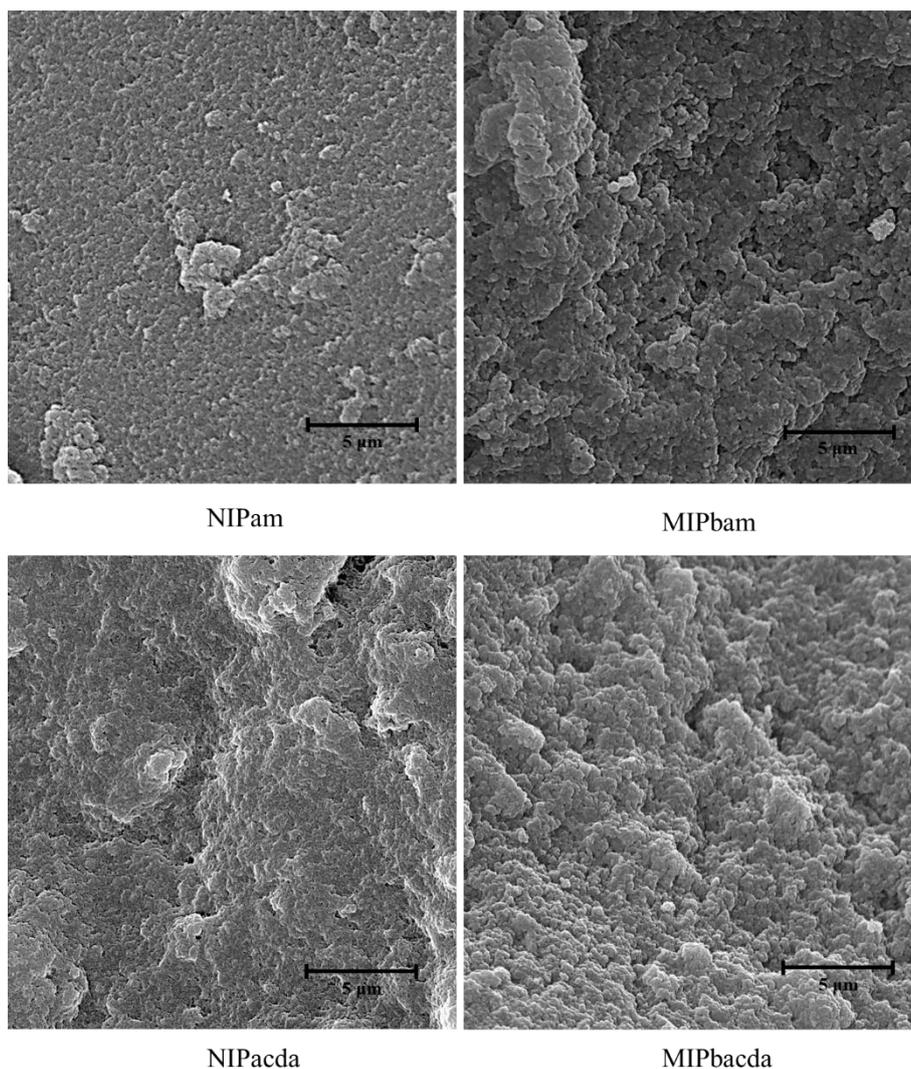


Figura 12: Imagens de microscopia de varredura eletrônica dos MIP's e NIP's. Legenda: am – ácido metacrílico; acda – acrilamida; b - β -cariofileno; (aumento de 22.000 vezes).

3.2 Caracterização térmica das camadas reconhecedoras do β -cariofileno.

As figuras abaixo mostram as curvas termogravimétricas referentes aos MIP's (antes e depois da extração) e NIP's baseados nos monômeros, ácido acrílico (Figura 13a), ácido metacrílico (Figura 13b) e acrilamida (Figura 13c), e a curva TG da molécula molde β -cariofileno está adicionada em cada gráfico dos respectivos polímeros para efeito de comparação da sua extração.

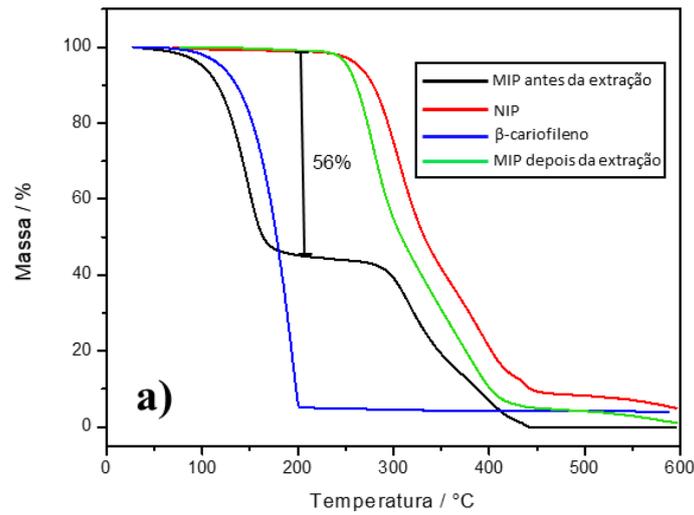


Figura 13a: Curvas TG's dos MIP's e NIP poli(ácido acrílico) e do padrão de β -cariofileno.

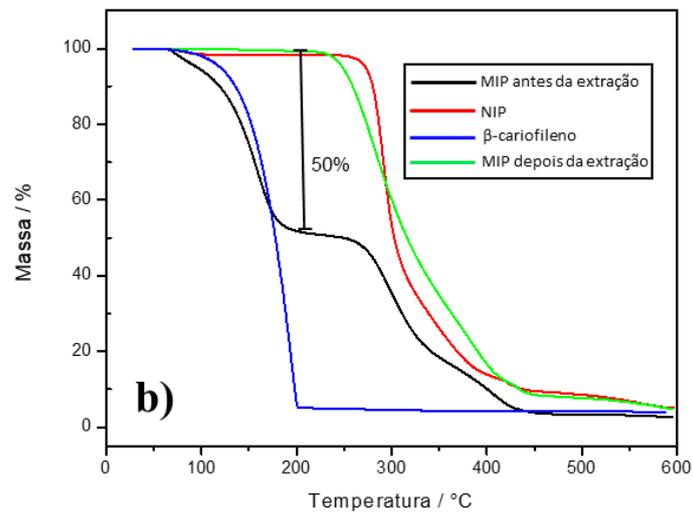


Figura 13b: Curvas TG's dos MIP's e NIP poli(ácido metacrílico) e do padrão de β -cariofileno.

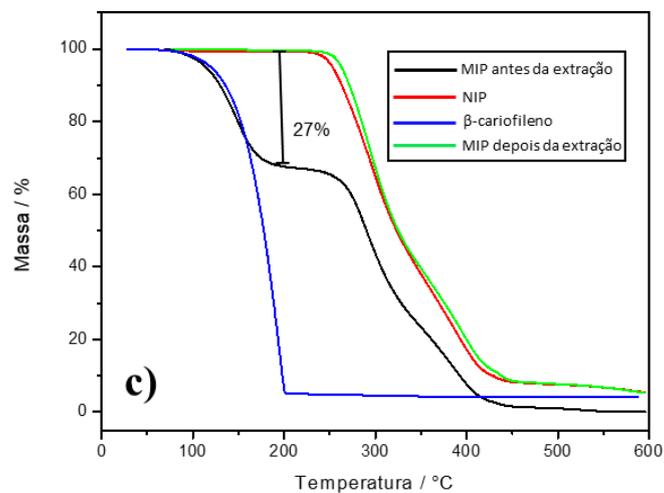


Figura 13c: Curvas TG's dos MIP's e NIP poli(acrilamida) e do padrão de β -cariofileno.

Nas figuras 13a, b e c são observados que um padrão de perda de massa para os MIP's após a extração da molécula modelo e respectivos NIP's. É verificada a presença de três eventos referentes à perda de massa, o primeiro em 100 °C, ocorre uma perda de massa entre 1 e 3% da quantidade inicial de massa analisada que pode ser atribuída à dessorção de água da matriz polimérica e à presença de solvente residual. Entre 238 e 440 °C observam-se duas perdas de massas sucessivas, de aproximadamente a 95% de perda de massa, que foram atribuídas à decomposição dos polímeros poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico) e poliacrilamida (SANTOS et al., 2009; MATA et al., 2014; MARESTONI et. al., 2014; DIMA et. al., 2014; WU et al., 2016).

Em relação as curvas termogravimétricas dos MIP's antes da extração da molécula modelo são observadas duas perdas de massas: a primeira a partir de 35 °C até os 185 °C atribuída à decomposição da molécula molde, β -cariofileno, com perda de cerca de 56% de perda massa para o MIP de poli(ácido acrílico), 50% para o MIP poli(ácido metacrílico) e de 27% para o MIP poliacrilamida. Dentre estes três percentuais de perda de massa, destaca-se o percentual referente ao MIP poli(ácido acrílico), que mostra uma maior quantidade de moléculas de β -cariofileno que ficaram retidas na estrutura polimérica do MIP. Dessa forma, é possível inferir que este polímero apresentou uma maior quantidade de cavidades tridimensionais receptoras, após o procedimento de extração.

Entre 238 e 440 °C são identificadas duas perdas de massas consecutivas referentes a degradação do polímero, correspondente aproximadamente a 40% para poli(ácido acrílico), 47% para o MIP poli(ácido metacrílico) e de 60% para o MIP poliacrilamida.

Para fins de comparação foi realizada a análise térmica do padrão comercial da molécula molde, β -cariofileno, utilizada nas sínteses dos MIP's. A curva

termogravimétrica do β -cariofileno apresentou, inicialmente, uma perda de massa de cerca de 2%, entre 20 e 100 °C atribuída à dessorção de água. A partir de 100 °C e até aproximadamente 200 °C é possível identificar, uma grande de perda de massa de cerca de 95% atribuída à evaporação de diversos voláteis que pertencem a mesma classe orgânica do β -cariofileno, os terpenos (HIJO et. al., 2015; FELIX et. al., 2017). Essa faixa de temperatura para terpenos, também é descrita por Vasconcelos e Godinho (2001), em estudo termogravimétrico para a detecção de adulterante em óleos de copaíba. Por outra parte é amplamente relatado que o principal marcador químico encontrado nos óleos de copaíba é β -cariofileno (BARBOSA et al., 2012; LEANDRO et. al., 2012).

3.3 Caracterização espectroscópica por Infravermelho com Transformada de Fourier

3.3.1 Caracterização do β -cariofileno

Observa-se no espectro de infravermelho (Figura 14) da amostra de β -cariofileno, um característico estiramento vibracional (3071 cm^{-1}) de =C-H, e estiramentos de vibrações assimétricas (2936 cm^{-1}) e simétricas (2859 cm^{-1}) típicas de CH_2 (SCHULZ & BARANSKA, 2007). As atribuições das principais bandas de todos os polímeros e das respectivas moléculas moldes, estão nos Anexos.

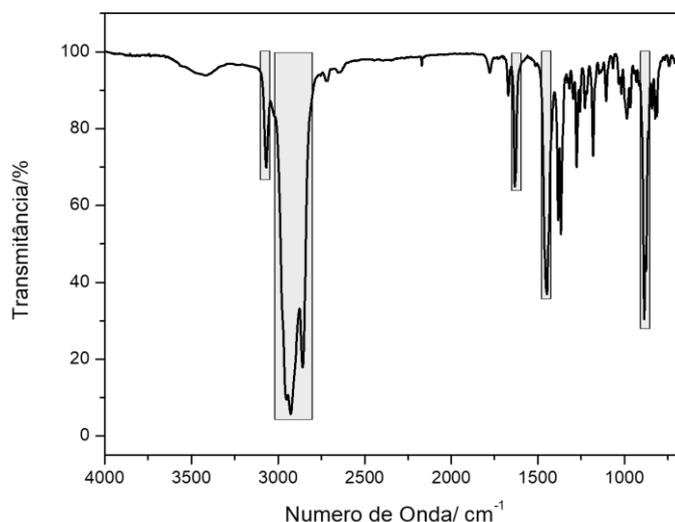


Figura 14: Espectros de IV-TF do sesquiterpeno β -cariofileno.

Um pequeno estiramento em 1671 cm^{-1} referente à frequência de absorção do grupo alquila ligado diretamente à ligação dupla do anel. O estiramento C=C (1633 cm^{-1}) referente à dupla ligação que está fora do anel terpênico e a banda de absorção de modo tesoura (1451 cm^{-1}) do CH₂ ligado ao carbono da dupla ligação fora do anel (SCHULZ et. al., 2003; LIU et. al., 2013).

Podem ser observados picos duplos (1383 e 1368 cm^{-1}) das vibrações de deformações simétricas do CH₃ atribuídas as duas metilas ligadas ao anel ciclobutano. Igualmente, pode ser observado um pico intenso em 886 cm^{-1} característico à vibração de deformação do =C-H fora do plano, que segundo a literatura (LIU et. al., 2013), de forma geral são os picos mais fortes do espectro.

3.3.2 Caracterização espectroscópica por IV-TF das camadas reconhecedoras do β -cariofileno

As sínteses dos MIP's para o β -cariofileno foram realizadas utilizando três diferentes monômeros funcionais: acrilamida, ácido acrílico e ácido metacrílico. Foram sintetizados também os polímeros não impressos obtidos com ausência da molécula molde para fins comparativos.

Após o procedimento de extração da molécula molde das estruturas dos MIP's, e realizado o processo de lavado dos NIP's, como descrito anteriormente, foram realizadas as respectivas caracterizações através da técnica de IV-TF. Desta forma foi selecionado o MIP que apresentou melhor desorção da molécula molde após o procedimento de extração para ser utilizado como elemento de reconhecimento nos sensores eletroquímicos.

3.3.3 – Caracterização da camada reconhecadora derivada do monômero acrilamida

A Figura 15 ilustra o espectro vibracional na região do infravermelho para o polímero não impresso do monômero acrilamida.

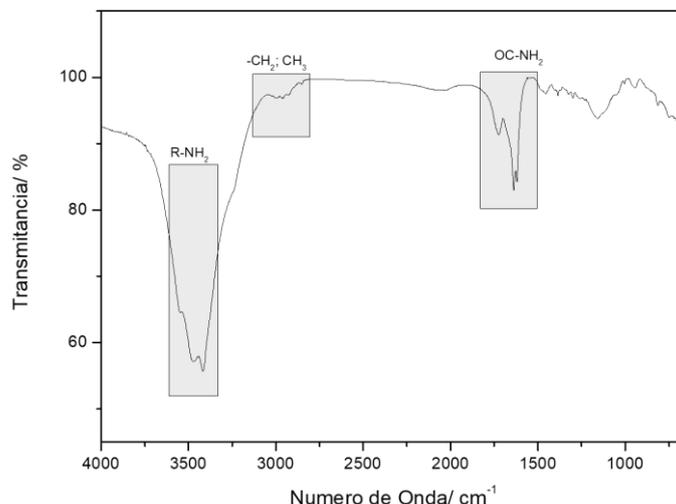


Figura 15: Espectro de IV-TF do NIP de acrilamida.

Neste espectro é observado uma proeminente deformação axial em 3400-3500 cm^{-1} correspondente ao grupo funcional R-NH₂ pertencente a poli(acrilamida) (SADICOFF et. al., 2001; DA MATA et. al., 2014).

Baixas vibrações de alongamentos assimétricos de CH₂ e CH₃, próximas de 3000 cm^{-1} , que pertencem a cadeia polimérica da acrilamida (DA MATA et. al., 2014). E bandas entre 1618 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} que são características de grupamentos -NH e OC-NH₂ (SUN et. al., 1999; GUPTA et. al., 2003).

Os espectros da Figura 16 não mostram mudanças significativas entre o NIP, MIP depois da extração e MIP antes da extração em relação as vibrações características da poli(acrilamida), que estão presentes nos três polímeros, mostrando que a síntese ocorreu normalmente.

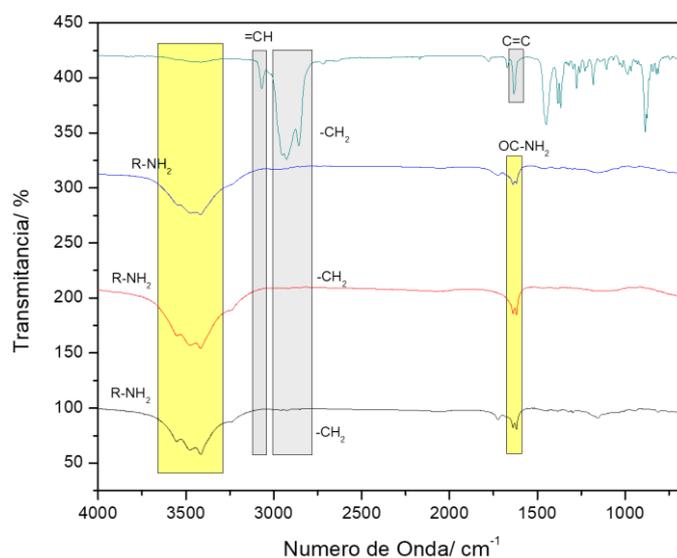


Figura 16: Espectros de IV-TF do β -cariofileno e seus respectivos NIP, e MIP's antes e depois da extração.

Na Figura 17, é possível perceber que o espectro do MIP antes e depois da extração são muito semelhantes. A diferença entre estes MIP's, está na presença de estiramentos característicos grupos funcionais do sesquiterpeno β -cariofileno.

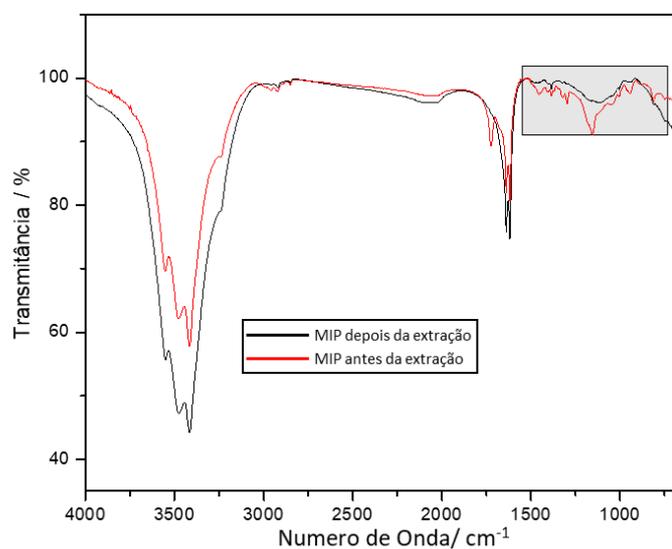


Figura 17: Espectros de IV-TF dos MIP's antes e depois da extração de β -cariofileno

O MIP depois da extração, que passou pelo processo de extração da molécula molde, não apresentou as vibrações características do β -cariofileno. E no espectro referente ao MIP antes da extração, na região cinza em destaque, é possível observar a presença dos estiramentos dos principais grupos funcionais do β -cariofileno, porém essas vibrações não apresentaram bandas muito proeminentes, fato que já era esperado, pois como foi observado nos resultados das análises termogravimétricas, a quantidade de β -cariofileno que ficou retida na amostra do MIP antes da extração foi de apenas 27%.

3.3.4 - Caracterização da camada reconhecadora derivada do monômero ácido metacrílico

Na Figura 18 é apresentado o espectro vibracional referente ao NIP de ácido metacrílico. Observa-se uma banda em 3200-3400 cm^{-1} atribuída ao estiramento dos grupos hidroxila do polímero do ácido metacrílico (LEE & DOONG, 2012).

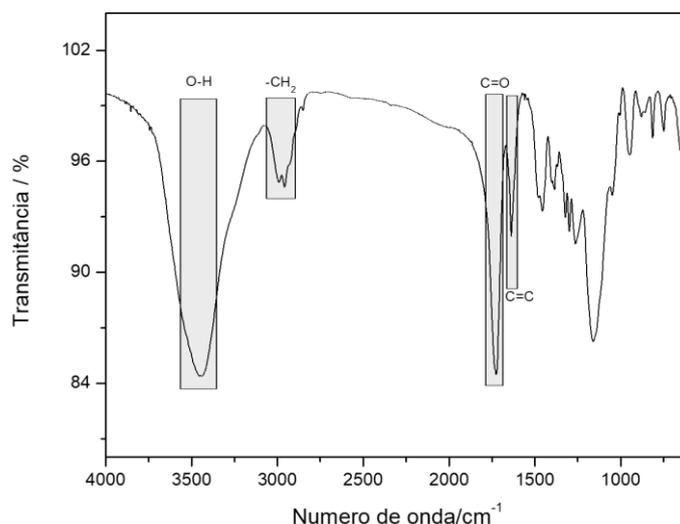


Figura 18: Espectro de IV-TF do NIP de ácido metacrílico.

Pequenos estiramentos de vibrações assimétricas (2961 cm^{-1}) e simétricas (2918 cm^{-1}) típicas de CH_2 , e um estiramento em 1633 cm^{-1} referente à dupla ligação entre carbonos (C=C). Em aproximadamente 1730 cm^{-1} é observada uma banda vibracional referente ao grupo carboxila (C=O) do ácido carboxílico (LIU et. al., 2012).

Abaixo, na Figura 19, são apresentados os gráficos referentes aos espectros de IV do β -cariofileno, NIP, e dos seus respectivos MIP's antes e depois da extração. Onde é possível observar as diferentes regiões e formas de cada espectro na região do IV.

Observa-se que nos espectros do NIP e MIP antes e depois da extração a presença de estiramentos correspondentes aos principais grupos funcionais do polímero sintetizado com ácido metacrílico como monômero em $3200-3400\text{ cm}^{-1}$ região atribuída ao grupo -OH e em 1730 cm^{-1} ao grupo carboxila (C=O) do ácido carboxílico.

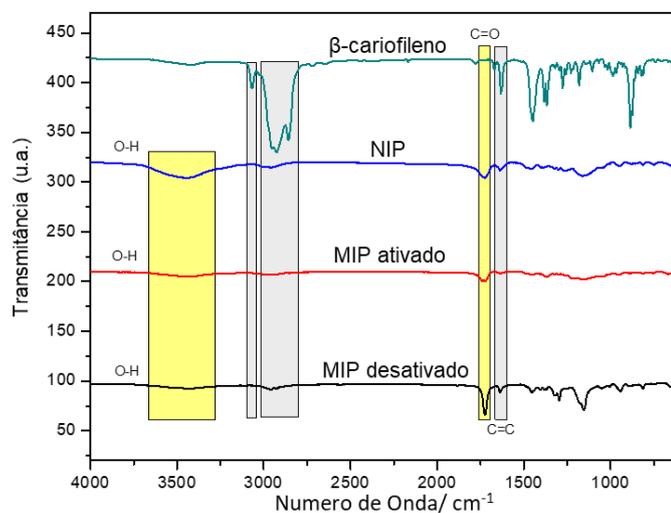


Figura 19: Espectros de IV-TF do β -cariofileno e seus respectivos NIP, e MIP's depois da extração de antes da extração.

Para uma melhor comparação, na Figura 20 são apresentados os espectros dos MIP's antes e depois da extração, e observa-se na região demarcada em cinza, onde são encontradas as vibrações moleculares dos estiramentos característicos do β -cariofileno, que o espectro do MIP antes da extração apresentou intensas vibrações do β -cariofileno em comparação MIP depois da extração.

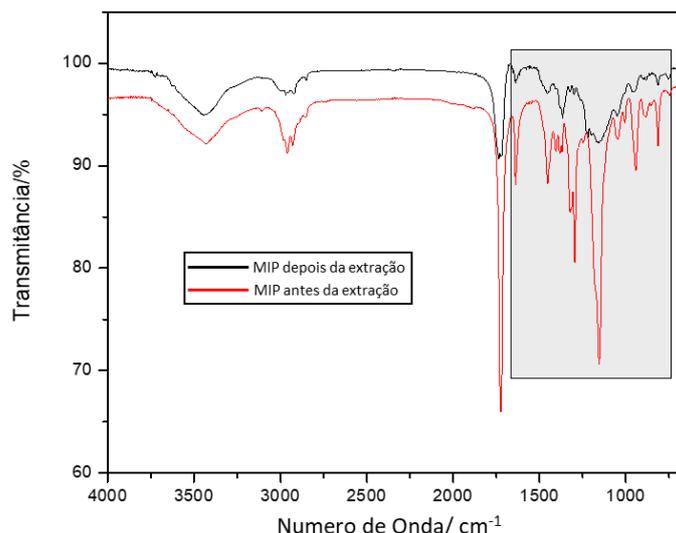


Figura 20: Espectros de IV-TF dos MIP's antes e depois da extração de β -cariofileno.

Estes resultados coincidem com os que foram observado nas medidas termogravimétricas destes dois polímeros. Na curva TG do MIP antes da extração apresentou um percentual de massa de 50% de β -cariofileno na estrutura deste polímero, e em relação a curva TG do MIP depois da extração, não foram observados traços significativos de β -cariofileno, dessa forma sendo esperado vibrações menores de β -cariofileno no IV-TF do MIP depois da extração, como foi observado anteriormente.

3.3.5 - Caracterização da camada reconhecedora derivada do monômero ácido acrílico

A Figura 21 mostra os espectros de IV-TF referente ao polímero não impresso do ácido acrílico, NIP, é observado uma ampla banda de absorção atribuída ao estiramento OH (3400 cm^{-1}). Estiramentos de vibrações assimétricas (2961 cm^{-1}) e simétricas (2918 cm^{-1}) típicas de CH_2 , e um pequeno estiramento em 1633 cm^{-1} referente à dupla ligação ($\text{C}=\text{C}$).

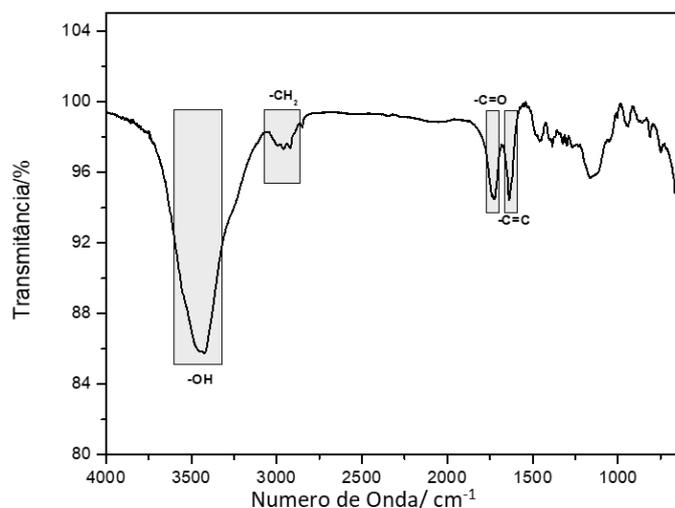


Figura 21: Espectro de IV-TF do NIP de ácido acrílico.

Uma banda vibracional referente ao grupo carboxila (C=O) do ácido carboxílico em 1724 cm^{-1} , que originariamente era uma banda de estiramento a 1670 cm^{-1} . Essa mudança de comprimento é correspondente a variação de energia do grupo funcional, indicando o envolvimento do grupo carboxílico na formação do polímero (UMEMURA & HAYASHI, 1974; RAVICHANDRAN et. al., 2004).

No MIP depois da extração do β -cariofileno (Figura 22), o seu espectro apresenta bandas de estiramentos semelhantes aos que foram encontradas no espectro do NIP. De fato, o MIP e o NIP apresentam vibrações moleculares semelhantes pois a diferença entre esses dois polímeros é a presença de sítios ativos de reconhecimento.

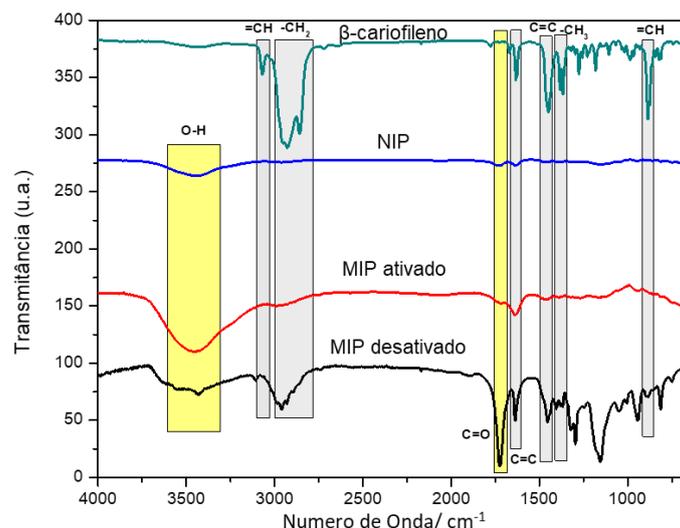


Figura 22: Espectros de IV-TF do β -cariofileno, NIP, e MIP's depois da extração de antes da extração.

Mas quando se compara os espectros dos polímeros de MIP's antes e depois da extração, observa-se claramente a presença de estiramentos característicos do β -cariofileno no seu respectivo MIP antes da extração (Figura 23).

No espectro do MIP antes da extração do β -cariofileno, é observado um pequeno estiramento vibracional em 3071 cm^{-1} , característico do grupo $=\text{C-H}$, que não é encontrado na estrutura do polímero de ácido acrílico, pois é o $=\text{C-H}$ que participa da reação de polimerização radicalar, e como foi citado anteriormente esta vibração está relacionada com o $=\text{C-H}$ da estrutura do β -cariofileno.

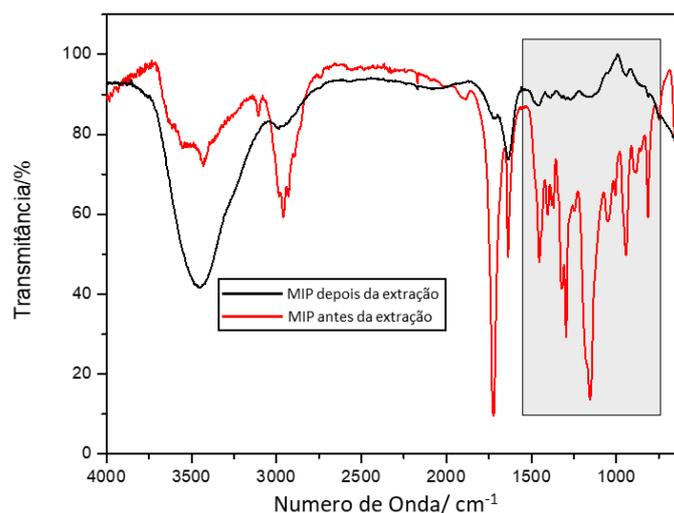


Figura 23: Espectros de IV-TF dos MIP's antes e depois da extração de β -cariofileno.

A região de vibrações assimétricas (2936cm^{-1}) e simétricas (2859cm^{-1}) típicas de CH_2 , e bandas atribuídas à vibração de deformação axial de grupos $\text{C}=\text{C}$, ficaram bem reduzidas no espectro do MIP depois da extração quando comparado ao MIP antes da extração. Assim, confirmando os resultados obtidos pela técnica de termogravimetria, onde a curva TG do MIP antes da extração apresentou uma porcentagem de perda de massa do β -cariofileno de 56%, portanto sendo previsto vibrações moleculares bastante intensas no IV-TF do MIP antes da extração.

Os resultados de IV-TF são semelhantes aos encontrados nos trabalhos de Khadro et. al., (2010) e Betatache et. al., (2014), onde observaram que após o procedimento de extração do analito de interesse, os polímeros molecularmente impressos não apresentavam mais os modos vibracionais da molécula modelo na estrutura tridimensional do polímero.

No presente trabalho, o analito em estudo é uma molécula da classe dos terpenos, dessa forma, apresentando uma estrutura completamente apolar. O tipo de interação que ocorre entre o polímero e molécula modelo é a não covalente (Ye L et. al., 2001), sendo

interações que se baseiam em ligações de hidrogênio, iônicas, ligações π - π , interações dipolo-dipolo, etc. (Ye L. & MOSBACH, 2008).

O sesquiterpeno β -cariofileno não apresenta em sua estrutura grupos funcionais específicos, como carboxila ou hidroxilas, que poderia gerar uma interação forte com a matriz polimérica (Figura 24). Dessa forma, propõe-se que interações não covalentes fracas, como as de Van Der Waals, governem na interação do polímero com a molécula molde.

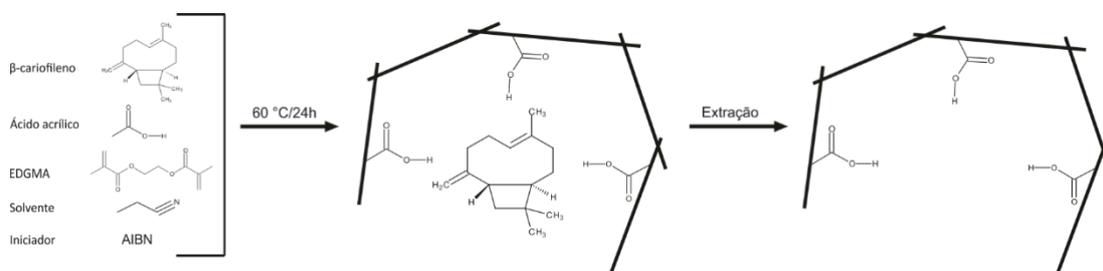


Figura 24: Esquema geral de síntese e interação do β -cariofileno no MIP.

Estes tipos de interações de moléculas terpênicas ou apolares já foram descritos na literatura, Chen et. al., (2014), estudando a detecção do terpeno α -pineno, sugeriu que forças fracas de Van Der Waals são a principal força de ligação entre o monoterpeno, α -pineno, e a matriz polimérica. E no trabalho de Asasuna et. al., (2004) observaram que a interação do polímero molecularmente impresso com molécula dioxina era do tipo hidrofóbica.

3.4 - Caracterização por espectroscopia Raman dos NIP e MIP de poli(ácido acrílico)

A Figura 25 apresenta o espectro Raman dos polímeros NIP e MIP's antes e depois da extração da molécula molde. As assinaturas espectrais Raman do NIP e do MIP antes da extração β -cariofileno, são semelhantes na posição dos picos. O comportamento pode estar relacionado à contribuição de grupos moleculares de β -cariofileno que possuem interação não covalente com a matriz polimérica (BATLOKWA et al., 2011).

Os picos localizados a 507 cm^{-1} e 603 cm^{-1} são devidos às vibrações do CO_2 fora do plano e da rotação do CO_2 , respectivamente. Os picos a 735 cm^{-1} e 835 cm^{-1} são atribuídos às vibrações de estiramento do C-OOH; os picos a 947 cm^{-1} , 1381 cm^{-1} , 1406 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} e 1722 cm^{-1} correspondem à vibração do alongamento C-C, curvatura C-H, estiramento CH_2 , alongamento C-H e estiramento C-O, respectivamente, nos grupos ácido carboxílico e acetila (NOMURA et al., 1983; DONG et al., 1997; MURLI & SONG, 2010). As atribuições de alguns modos, como 2902 cm^{-1} , 2932 cm^{-1} , 3046 cm^{-1} e 3110 cm^{-1} estão associadas ao estiramento CH e ligação CH_2 , e vibrações simétricas C-H e CH_2 e correspondem ao grupo carbonila presente no poli(ácido acrílico).

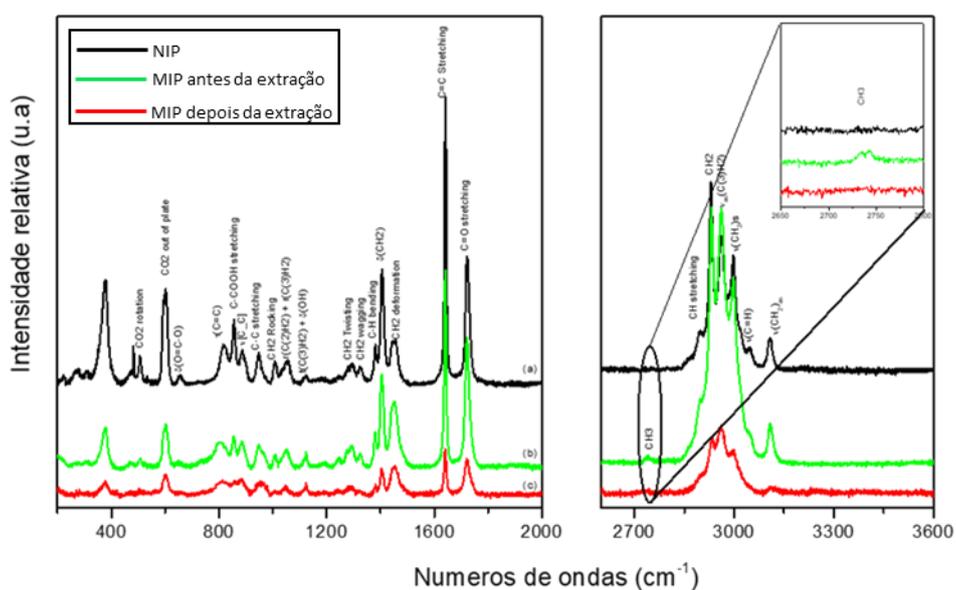


Figura 25: Espectro Raman dos polímeros NIP e MIP's antes e depois da extração.

Por outro lado, o pico localizado a 2057 cm^{-1} fica visível apenas no espectro de MIP antes da extração de β -cariofileno, mostrando que a molécula modelo foi extraída da matriz polimérica. Este pico corresponde ao modo de alongamento simétrico de CH_3 e pode estar associado ao carbono saturado.

3.5 - Análises por XPS dos NIP e MIP de poli(ácido acrílico)

Para uma análise aprofundada das espécies químicas presentes na superfície das amostras nos diferentes estados de funcionamento do MIP foram obtidos espectros de XPS de alta resolução. Os espectros de alta resolução nas bordas de XPS C1s e O1s são mostrados na Figura 26 para o NIP e MIP antes e depois da extração da molécula molde. Eles estavam equipados com três picos, usando curvas Voigt simétricas baseadas na deconvolução de Gauss e Lorentzian (JAIN et al., 2018).

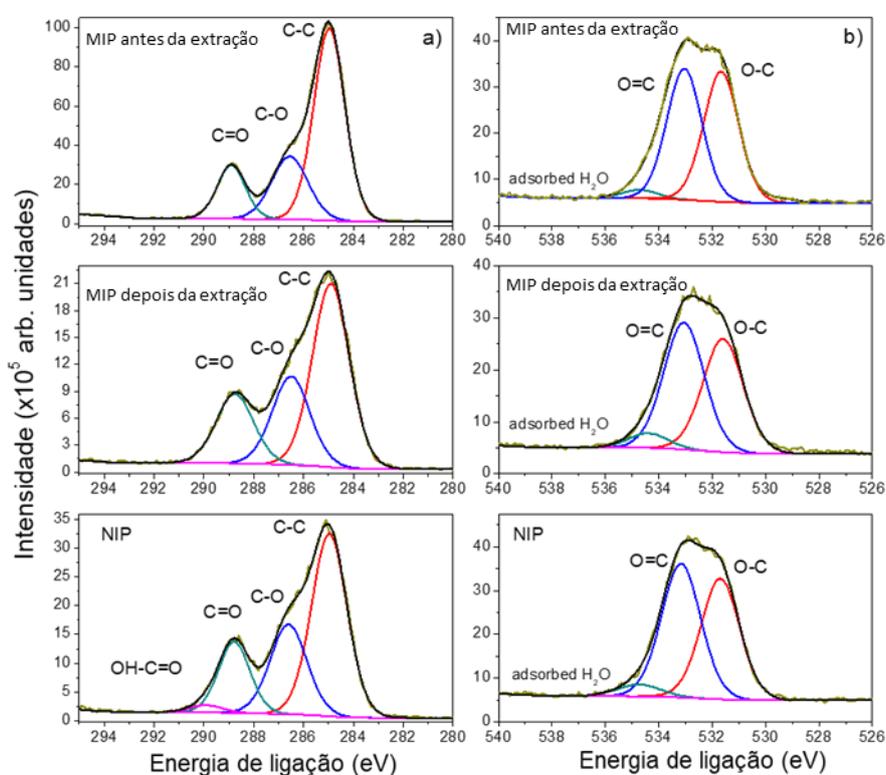


Figura 26: Espectros de XPS de alta resolução dos níveis de núcleo de C1s (a) e O1s (b) para MIP antes e depois da remoção do β -cariofileno e do NIP

Nos espectros deconvoluídos na borda C1s, o primeiro pico foi atribuído às ligações C-C na cadeia alifática do poli(ácido acrílico) presente na matriz polimérica, o segundo ao C-O ligado ao terceiro ao carbonila, C=O, presente no grupo funcional de monômero de ácido acrílico (WARD et al., 2003; LOUETTE et al., 2005). Nos espectros

nas bordas O1s, o primeiro pico foi atribuído às ligações C-O, depois a carbonila, C = O e o terceiro à água adsorvida (LOUETTE et al., 2005).

As Figuras 26a e b mostram os espectros nas bordas Cs1 para NIP poli(ácido acrílico) e para MIP após a extração do β -cariofileno. Observou-se uma grande semelhança na forma dos espectros assim como não foi identificada nenhuma mudança na energia de ligação devido à grande similaridade no ambiente químico no nível do C1s após a extração do β -cariofileno. Assim, a razão de porcentagens atômicas entre C-C e C-O para o NIP e MIP após extração do β -cariofileno é muito próxima: 1,96 e 2,02, respectivamente, indicando que o ambiente químico ao redor dos átomos de carbono e oxigênio não se alterou com a ausência do β -cariofileno na matriz polimérica.

As Figuras 28b e c mostram os espectros de XPS nas bordas C1s para o MIP antes da extração da molécula de β -cariofileno e para o MIP após a extração da molécula de β -cariofileno. Aqui, é possível notar uma diferença acentuada nas intensidades de pico atribuídas à ligação C-C, devido à presença de átomos de carbono sp^2 e sp^3 presentes na estrutura do β -cariofileno. O β -cariofileno é uma molécula de estrutura bicíclica com grupos alquílicos (-CH, CH₂, -CH₃ e =CH₂) que formam interações intermoleculares não-covalentes do tipo forças de dispersão (também conhecidas como forças de London), que são interações intermoleculares fracas que ocorrem pelo fenômeno de indução do momento dipolar da nuvem eletrônica (MAROM et al., 2011).

Os valores das porcentagens atômicas das ligações C-C e C-O mostram uma significativa de 2,03 (ausência de β -cariofileno) para um valor de 2,63 (presença de β -cariofileno) indicando fortemente a contribuição dos átomos de carbono sp^2 e sp^3 da molécula de β -cariofileno. Sabe-se que a interação intermolecular entre o cariofileno e as cavidades ativas formadas no MIP, principalmente pelo grupo carbonila, C=O ocorrem por dipolo induzido-dipolo permanente (NOVAK & KOVA, 2005; HU et al., 2010; EL-

SHALL et al., 2002). Não foram identificadas mudanças significativas na borda do O1s com a presença ou ausência do cariofileno no MIP. Em resumo, tais resultados corroboram com os apresentados pelas espectroscopias Raman e IV-TF.

3.6 Caracterização eletroquímica do sensor para β -cariofileno

3.6.1 Estudo do comportamento dos eletrodos modificados

Para dar início aos estudos da interação entre o analito e o elemento de reconhecimento, foi realizada a caracterização voltamétrica dos eletrodos modificados.

Como descrito anteriormente na parte experimental, foram fabricados dois eletrodos modificados a base de pasta de carbono, um eletrodo que continha a mistura de pasta de carbono e NIP e um eletrodo contendo pasta de carbono e MIP depois da extração.

Após as análises dos resultados de IV-TF e TGA foi possível selecionar o polímero que apresentou um melhor desempenho na extração do β -cariofileno. Dentre os três polímeros sintetizados, o derivado do monômero ácido acrílico foi o que apresentou a menor contribuição das vibrações moleculares nas regiões características do β -cariofileno, que significa uma extração extensiva e a formação das respectivas cavidades desocupadas na matriz polimérica.

O β -cariofileno é uma substância orgânica apolar que apresenta baixa eletroatividade, assim utilizou-se o método de detecção indireta, medindo a resposta eletroquímica da solução do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Na Figura 27 são apresentados os resultados das medidas de voltamétrica cíclica dos eletrodos NIP, MIP depois da extração e MIP antes da extração em solução $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

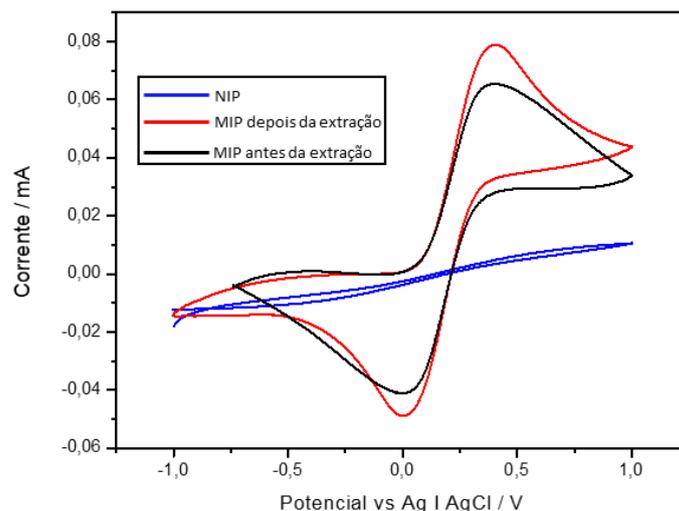


Figura 27: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos NIP, MIP's antes e depois da extração.

Na figura 27 foi observado que o voltamograma relacionado com o eletrodo NIP não apresentou o perfil característico do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Como o NIP é formado unicamente pelo polímero e, não apresenta as cavidades geradas pela molécula molde como no MIP, o processo de difusão do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ é limitado ou inexistente.

Nos voltamogramas referentes às medidas dos eletrodos MIP antes e depois da extração, é possível identificar que estes apresentaram o perfil característico do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, resultados esperados para estes polímeros, pois eles fornecem as cavidades necessárias para a difusão das espécies e as reações de transferência de elétrons sobre a superfície do eletrodo (TARLEY, et. al., 2005).

3.6.2 Detecção do β -cariofileno

Após a verificação do funcionamento dos eletrodos modificados foram realizados estudos eletroanalíticos sobre o reconhecimento do β -cariofileno.

O eletrodo de MIP depois da extração foi imerso em soluções padrões, com diferentes concentrações do β -cariofileno. Na Figura 28, são apresentados os

voltamogramas de onda quadrada (VOQ) resultantes da detecção dos íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a diferentes concentrações de β -cariofileno.

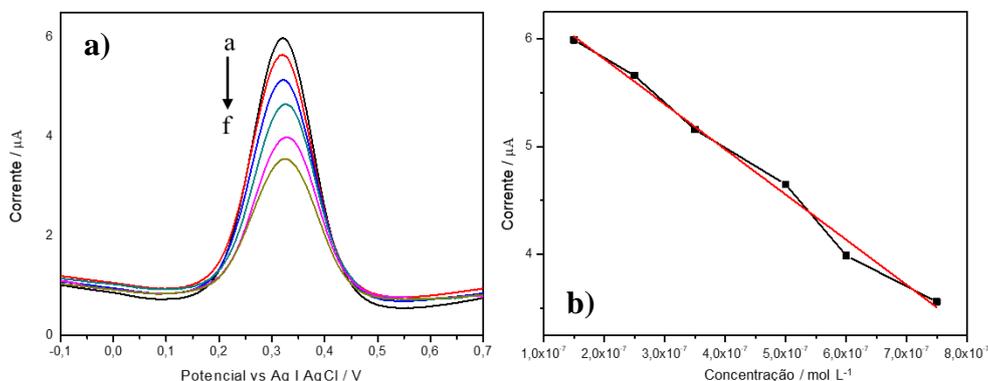


Figura 28: a) VOQ do eletrodo MIP depois da extração em diferentes concentrações de β -cariofileno. Faixa de concentrações de β -cariofileno utilizadas, a – f: $1,5 \times 10^{-7}$, $2,5 \times 10^{-7}$, $3,5 \times 10^{-7}$, 5×10^{-7} , 6×10^{-7} e $7,5 \times 10^{-7}$ M, respectivamente. A relação linear entre a corrente de pico e a concentração de β -cariofileno na faixa de $1,5 \times 10^{-7}$ - $7,5 \times 10^{-7}$ M.

Na figura 30a é possível observar uma diminuição das respectivas correntes nos picos anódicos à medida que a concentração de β -cariofileno aumenta. A diminuição dos valores pode ser explicada pelas limitações no mecanismo de difusão do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ através das cavidades geradas no polímero à medida que a concentração do β -cariofileno aumenta. Assim, as molécula do β -cariofileno, vão ocupando os sítios ativos e limitando a passagem dos íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, e conseqüentemente diminuindo seus picos anódicos. Com os dados de corrente de pico foi gerada a equação de regressão linear para $i_p (\mu\text{A}) = 0,4(\mu\text{M}) C + 6,6524$ com $R^2 = 0,9916$, na figura 30b. O limite de detecção do eletrodo proposto é $0,72 \mu\text{g/L}$.

Esse processo de diminuição de corrente é relatado na literatura através de diferentes estudos. Kan et al., (2012) e Luo et al., (2014) reportaram um sensor para hemoglobina bovina e observaram a relação entre o aumento na concentração da proteína com a diminuição da corrente de pico do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Resultados semelhantes também foram observados por Betatache et. al., (2013), na determinação de testosterona,

Duan, et. al., (2013) no estudo sobre detecção de epigallocatequina-3-galato em chás, e Chen et. al., (2013) na detecção de 4-nonifenol.

3.6.3 Teste de detecção de β -cariofileno em amostras de óleo de Copaíba

Foram realizados estudos em amostras de óleos de copaíba para a avaliação do sensor proposto para a determinação de β -cariofileno. As amostras de óleo foram disponibilizadas pelo Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior, responsável pelo laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-BiomA), localizado no Departamento de Química da UFAM.

Foram realizadas análises de VOQ em triplicata de duas amostras de óleo de copaíba *in natura* com concentrações de β -cariofileno 3×10^{-7} e $5,5 \times 10^{-7}$ mol/L. Os resultados das medidas em óleo de copaíba, foram adicionados no resultado da curva de calibração obtida para o β -cariofileno, como pode ser observado na figura 29 abaixo.

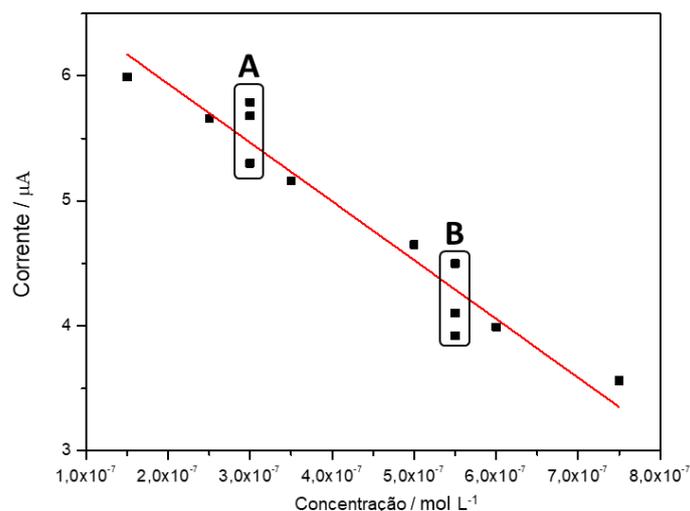


Figura 29: Aplicação real: testes de detecção do β -cariofileno em amostra de óleo de copaíba *in natura*. A – Triplicata da concentração de 3×10^{-7} mol/L; B - Triplicata da concentração de $5,5 \times 10^{-7}$ mol/L.

As respostas dos sinais analíticos correspondentes à concentração 3×10^{-7} mol/L, apresentaram valores de correntes próximos ao que foi encontrado para a solução $2,5 \times 10^{-7}$ mol/L de β -cariofileno, e as respostas dos picos correntes referentes à solução $5,5 \times 10^{-7}$ mol/L de copaíba, apresentaram valores de correntes aproximados ao observado na concentração 6×10^{-7} mol/L da solução de β -cariofileno.

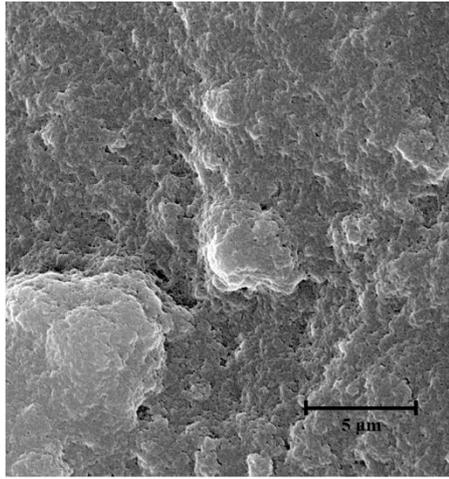
Estes resultados demonstram a viabilidade da aplicação do sensor para o β -cariofileno em amostras de óleo de copaíba.

CAPÍTULO IV – SENSOR PARA ÓXIDO DE CARIOFILENO

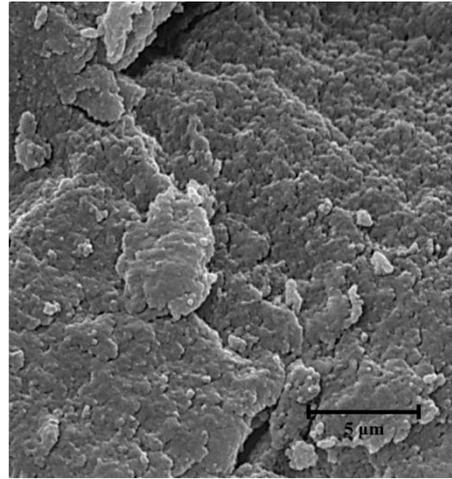
4.1 - Caracterização morfológica dos MIP's de óxido de cariofileno

Os MIP's de óxido de cariofileno, foram sintetizados utilizando o método convencional de bulk e apresentando formações de partículas irregulares, como esperado (BELTRAN et al., 2010). Nas Figuras 30 e 31 são observadas as micrografias para os NIP's e MIP's após a extração da molécula molde.

Apesar de todos os polímeros (MIP e NIP) terem sido polimerizados da mesma forma, exceto os NIP's que foi sintetizado sem o óxido de cariofileno, apenas o MIP_{oaa} apresentou porosidade em sua estrutura após extração do analito, quando comparado ao NIP_{aa}.

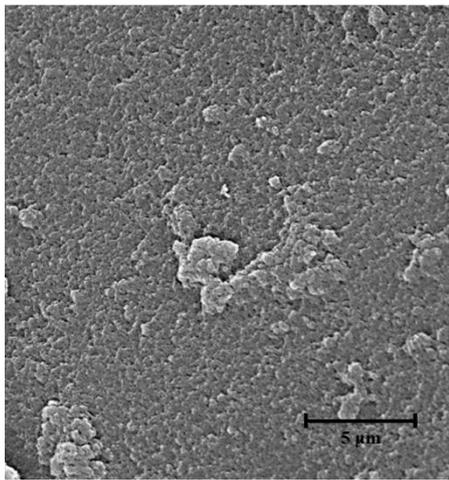


NIPaa

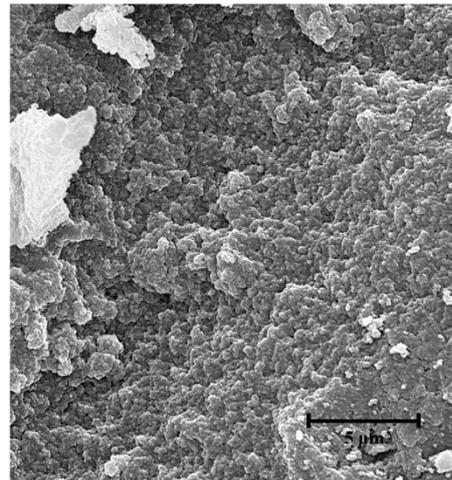


MIPoaa

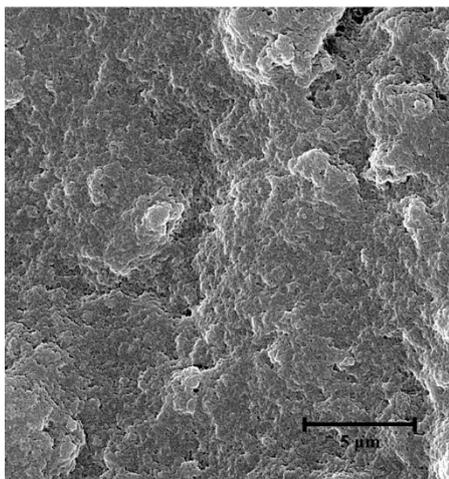
Figura 30: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos MIP's e NIP's.
Legenda: aa – ácido acrílico; o – óxido de cariofileno; (aumento de 22.000 vezes).



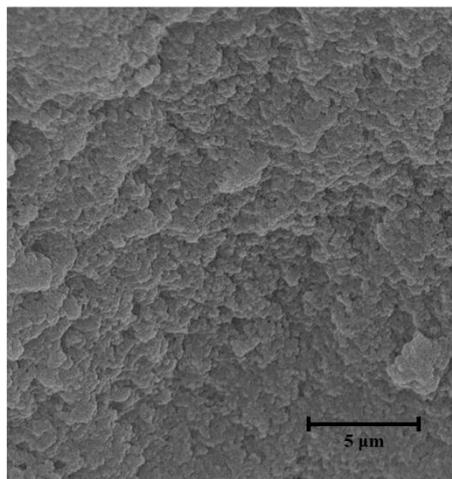
NIPam



MIPoam



NIPacda



MIPoacda

Figura 31: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos MIP's e NIP's. Legenda: am – ácido metacrílico; acda – acrilamida; o – óxido de cariofileno; (aumento de 22.000 vezes).

4.2 - Caracterização térmica das camadas reconhecedoras do óxido de cariofileno

As curvas termogravimétricas referentes aos MIP's (antes e depois da extração) e NIP's dos monômeros, ácido acrílico (Figura 32a), ácido metacrílico (Figura 32b) e acrilamida (Figura 33c), e a curva TG da molécula óxido de cariofileno está adicionada em cada gráfico dos respectivos polímeros para efeito de comparação da sua extração.

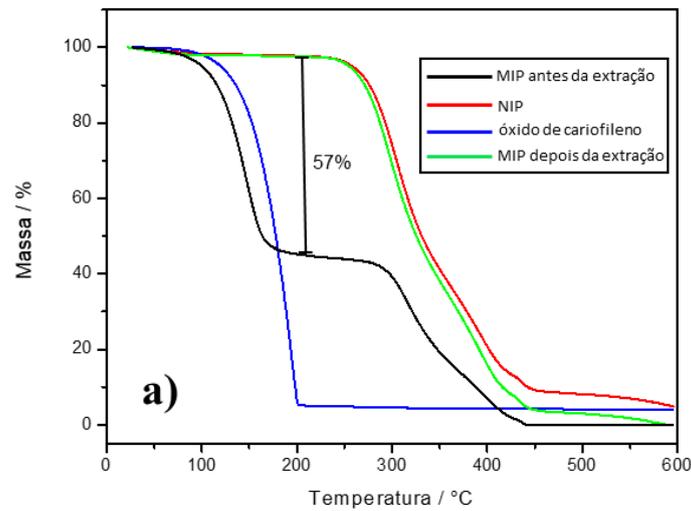


Figura 32a: Curvas TG's dos MIP's e NIP poli(ácido acrílico) e do padrão de óxido de cariofileno.

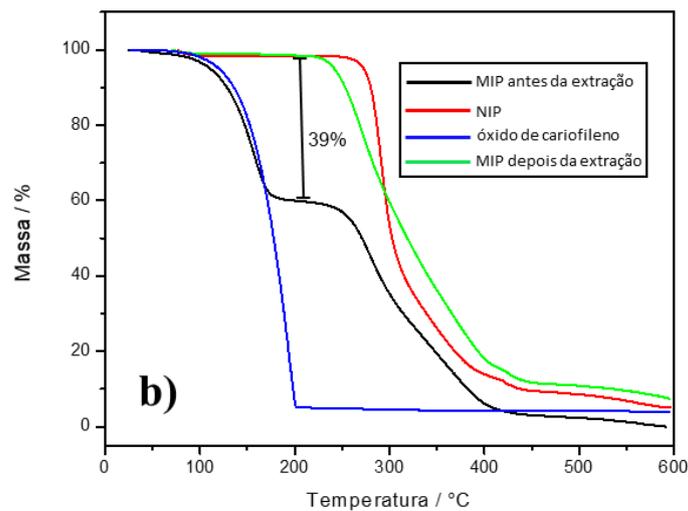


Figura 32b: Curvas TG's dos MIP's e NIP poli(ácido metacrílico) e do padrão de óxido de cariofileno

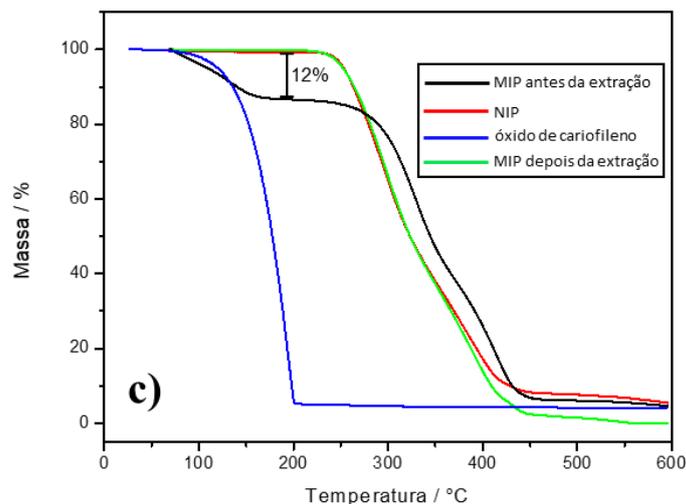


Figura 32c: Curvas TG's dos MIP's e NIP poliacrilamida e do padrão de óxido de cariofileno.

Verifica-se nos resultados obtidos pela técnica termogravimétrica de todos os MIP's após a extração da molécula modelo e respectivo NIP's, a presença de três eventos referentes à perda de massa, primeiramente a 100 °C, ocorre uma perda de massa de 1 a 2% da quantidade inicial de massa analisada que pode ser atribuída ao desprendimento de água da matriz polimérica e de solvente residual. Na faixa de 238 a 440 °C observam-se duas perdas de massas consecutivas, que correspondem aproximadamente a 94% de perda de massa, que foram atribuídas à decomposição dos polímeros poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico) e poliacrilamida (SANTOS et al., 2009; MATA et al., 2014; MARESTONI et. al., 2014; DIMA et. al., 2014; WU et al., 2016).

No que concerne as curvas termogravimétricas dos MIP's antes da extração da molécula modelo são observadas duas perdas de massas: a primeira de 35 °C até 185 °C atribuída à decomposição óxido de cariofileno, com perda de cerca de 57% de perda massa para o MIP poli(ácido acrílico), 39% para o MIP poli(ácido metacrílico) e de 12% para o MIP poliacrilamida. Assim como foi observado no MIP sintetizado para a molécula molde β -cariofileno, percentual de perda de massa do óxido de cariofileno foi maior para o MIP poli(ácido acrílico), mostrando uma grande quantidade de moléculas de óxido de cariofileno ficaram retidas na estrutura tridimensional do MIP. Sugerindo-se também que

este polímero exibiu uma maior quantidade de cavidades receptoras, após o procedimento de extração.

Na faixa de 238 a 440 °C são verificadas duas perdas de massas sucessivas relacionadas a degradação do MIP, que correspondem aproximadamente a 42% para poli(ácido acrílico), 59% para o MIP poli(ácido metacrílico) e de 86% para o MIP poliacrilamida.

Em relação a curva TG do padrão óxido de cariofileno, a partir de 92 °C até aproximadamente 200 °C, ocorreu um grande decaimento de perda de massa de cerca de 94%, posteriormente pelo decaimento da linha base. Na literatura, estudos relacionados às análises térmicas de constituintes terpênicos, mesma classe do óxido de cariofileno, descrevem intervalos de temperatura semelhantes aos encontrados neste trabalho (HIJO et. al., 2015; FELIX et. al., 2017). No estudo termogravimétrico para a detecção de adulterante em óleos de copaíba, Vasconcelos e Godinho (2001) descreveram que os terpenos de óleos copaíba apresentaram intervalo de temperatura semelhante ao do presente estudo.

4.3 - Caracterização espectroscópica por Infravermelho com Transformada de Fourier

4.3.1 - Caracterização do óxido de cariofileno

Na literatura, até o presente momento, não foi encontrada nenhuma descrição sobre análises na região do infravermelho em relação ao óxido de cariofileno. Como sua biossíntese é a mesma do β -cariofileno, por apresentarem estruturas semelhantes (Figura 33), e segundo a literatura, o óxido de cariofileno pode ser também um subproduto da auto-oxidação do beta-cariofileno pela sua exposição ao oxigênio do ar (DEWICK, 2002; SKÖLD et. al., 2006), espera-se encontrar espectros semelhantes, e assim caracterizá-lo.

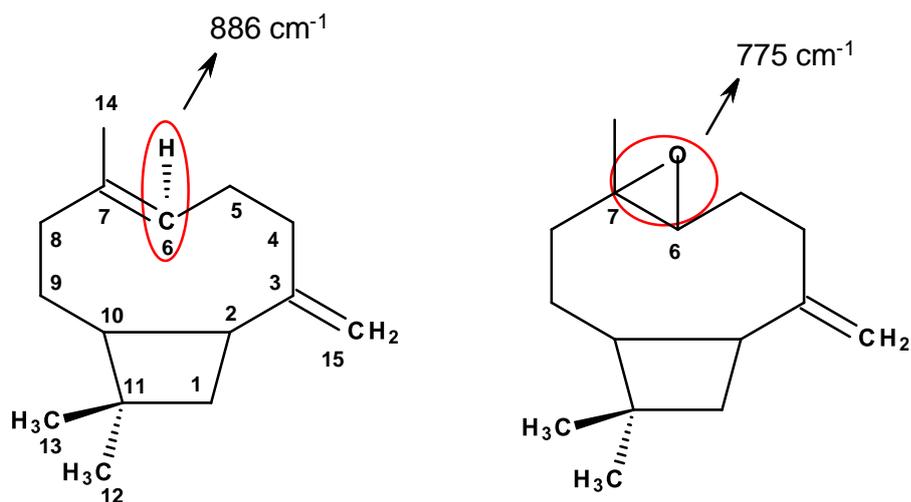


Figura 33: Diferenças estruturais entre β -cariofileno e óxido de cariofileno
 Na Figura 34 são apresentados os espectros na região do infravermelho dos dois

constituintes sesquiterpênicos, é observado um estiramento vibracional característico em 3071 cm^{-1} de hidrogênio ligado a um carbono com dupla ligação ($=\text{C}-\text{H}$), e estiramentos de vibrações assimétricas (2936 cm^{-1}) e simétricas (2859 cm^{-1}) típicas de CH_2 (SCHULZ & BARANSKA, 2007).

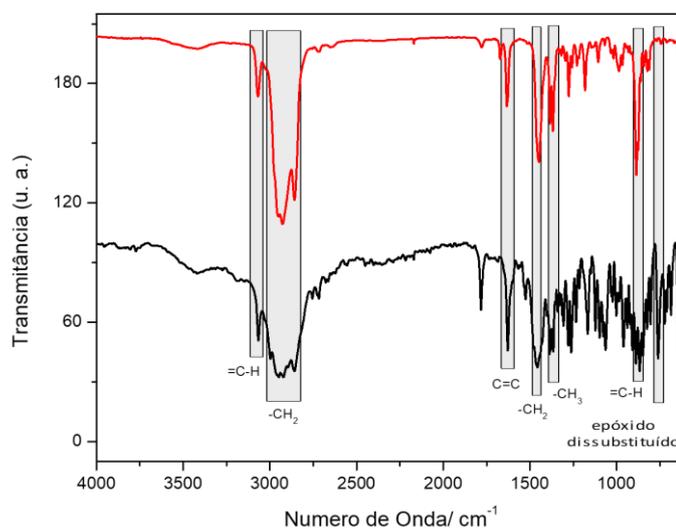


Figura 34: Espectros de IV-TF dos sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno.

Estiramento $\text{C}=\text{C}$ (1633 cm^{-1}) referente à ligação dupla que está fora do anel terpênico. Banda de absorção modo tesoura (1451 cm^{-1}) do CH_2 ligado ao carbono da dupla ligação fora do anel. E picos duplos (1383 e 1368 cm^{-1}) das vibrações de

deformações simétricas do CH₃ atribuídas as duas metilas ligadas ao anel ciclobutano. Um estiramento em 1671 cm⁻¹ referente a frequência de absorção de grupo alquila ligado diretamente à ligação dupla do anel. (SCHULZ et. al., 2003; LIU et. al., 2013).

Analisando as estruturas do β-cariofileno e do óxido de cariofileno, observa-se que a única diferença entre os dois constituintes é a oxidação da ligação dupla do carbono 6 do β-cariofileno, transformando em um epóxido dissustituído (Figura 34).

Um acentuado pico em 886 cm⁻¹ característico a vibração de deformação do =C-H fora do plano, que segundo a literatura, são os picos mais fortes que aparecem no espectro (SCHULZ & BARANSKA, 2007; LIU et. al., 2013).

E como foi relatado anteriormente, a principal diferença entre as duas moléculas é a presença do grupo epóxido no óxido de cariofileno, isso foi confirmado pela ausência do estiramento em 775 cm⁻¹ no espectro do β-cariofileno, e sua presença proeminente no espectro do óxido de cariofileno. Essa absorção no extremo inferior do espectro é característica de grupo epóxido dissustituído, como no sesquiterpeno óxido de cariofileno (PAVIA et. al., 2015).

4.3.2 - Caracterização espectroscópica por IV-TF das camadas reconhecedoras do óxido de cariofileno

As polimerizações dos MIP's para o óxido de cariofileno foram realizadas a partir de três monômeros funcionais diferentes: acrilamida, ácido acrílico e ácido metacrílico. E sendo sintetizado também os polímeros sem a presença do óxido de cariofileno, os não impressos, para a comparação entre as estruturas polímeros.

Após o procedimento de extração da molécula molde das estruturas dos MIP's, e o processo de limpeza dos NIP's, descrito na metodologia, foram realizadas as análises de caracterizações por IV-TF.

A partir dos resultados obtidos por infravermelho, foi escolhido o MIP que apresentou melhor desorção da molécula após o procedimento de extração. Dessa forma, sendo possível ser utilizado como elemento de reconhecimento nos sensores eletroquímicos.

4.3.3 - Caracterização da camada reconhecedora derivada do monômero acrilamida

O espectro vibracional apresentado na Figura 35, é referente ao NIP do monômero acrilamida. Nele, é observado uma deformação axial em 3400-3500 cm^{-1} correspondente ao grupo R-NH_2 do monômero funcional acrilamida (SADICOFF et. al., 2001; DA MATA et. al., 2014).

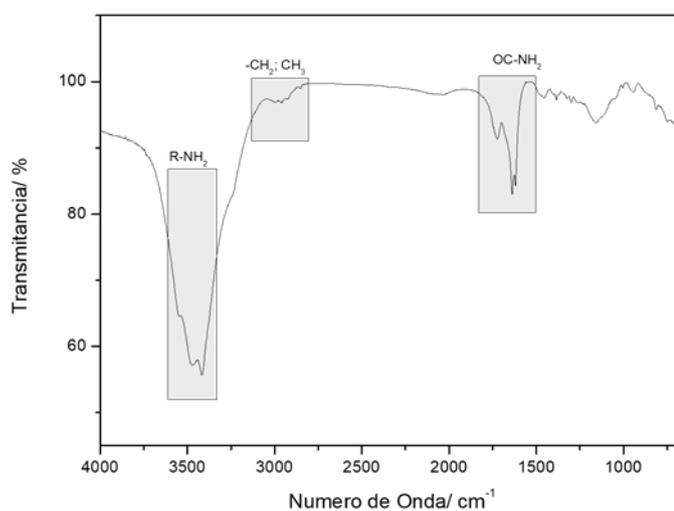


Figura 35: Espectro de IV-TF do NIP de acrilamida.

Bandas entre 1618 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} que são características de grupamentos $-\text{NH}$ e OC-NH_2 (SUN et. al., 1999; GUPTA et. al., 2003). Pequenas vibrações de alongamentos assimétricos de CH_2 e CH_3 próximas de 3000 cm^{-1} , que pertencem a cadeia polimérica da acrilamida (DA MATA et. al., 2014).

Os gráficos referentes aos espectros de IV do óxido de cariofileno, NIP, e dos seus respectivos MIP's antes e depois da extração, são apresentados na Figura 36. Onde é possível observar as diferentes regiões e formas de cada espectro na região do IV.

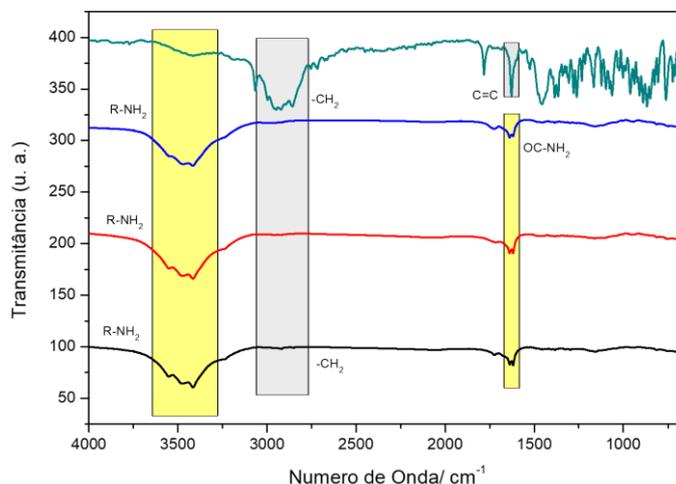


Figura 36: Espectro de IV-TF do óxido de cariofileno e seus respectivos NIP, e MIP's depois da extração de antes da extração.

Nos espectros acima (Figura 36), as vibrações características do polímero de acrilamida estão presentes nos três polímeros, confirmando que a síntese ocorreu normalmente. Verifica-se não houve nenhuma mudança significativa entre os polímeros NIP, MIP depois da extração e MIP antes da extração em relação as bandas de absorção.

Na Figura 37, é possível perceber que os espectros dos MIP's antes e depois da extração são muito semelhantes. E na região cinza em destaque, é possível observar, no caso o espectro do MIP antes da extração, a presença de pequenos estiramentos de grupos funcionais do óxido de cariofileno.

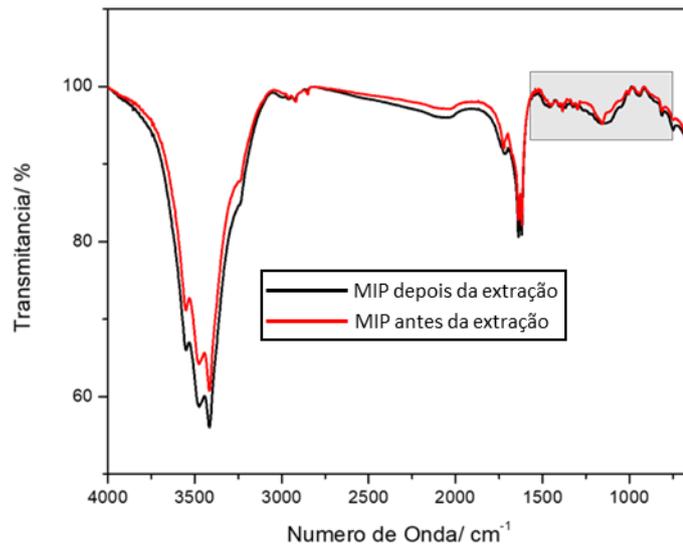


Figura 37: Espectros de IV-TF dos MIP's antes e depois da extração de óxido de cariofileno.

Essas pequenas vibrações encontradas neste espectro, estão relacionadas pelo fato de que poucas moléculas de óxido de cariofileno ficaram retidas na estrutura do MIP no processo de síntese, e este dado foi confirmado pelos resultados das análises termogravimétricas, onde a quantidade de óxido de cariofileno que ficou retida na amostra do MIP antes da extração foi de apenas 12%.

4.3.4 - Caracterização da camada reconhecedora derivada do monômero ácido metacrílico

O espectro vibracional do NIP de ácido metacrílico, é apresentado na Figura 38. Na região entre 3200-3400 cm^{-1} , observa-se uma banda atribuída ao estiramento dos grupos hidroxila do polímero do ácido metacrílico (LEE & DOONG, 2012).

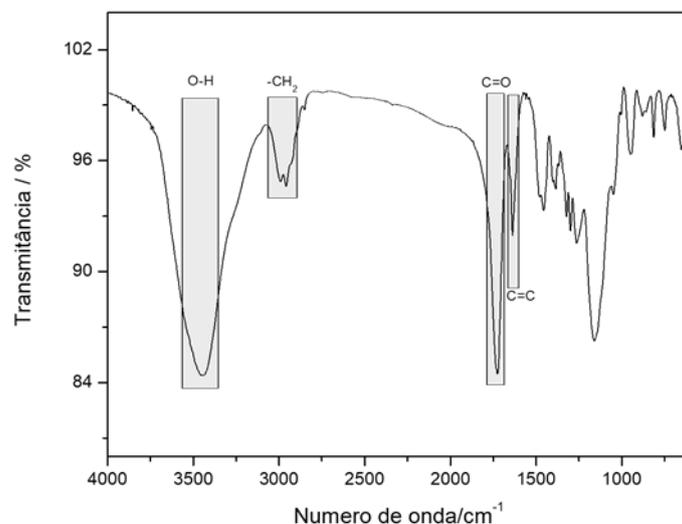


Figura 38: Espectro de IV-TF do NIP de ácido metacrílico.

É observado uma banda vibracional em 1730 cm^{-1} referente ao grupo carboxila ($\text{C}=\text{O}$) do ácido carboxílico. Estiramentos de vibrações assimétricas (2961 cm^{-1}) e simétricas (2918 cm^{-1}) típicas de CH_2 , e um estiramento em 1633 cm^{-1} referente à dupla ligação entre carbonos ($\text{C}=\text{C}$) (LIU et. al., 2012).

Na Figura 39 é possível observar as diferentes regiões e formas de cada espectro na região do IV, referentes ao óxido de cariofileno e dos polímeros NIP e MIP's antes e depois da extração.

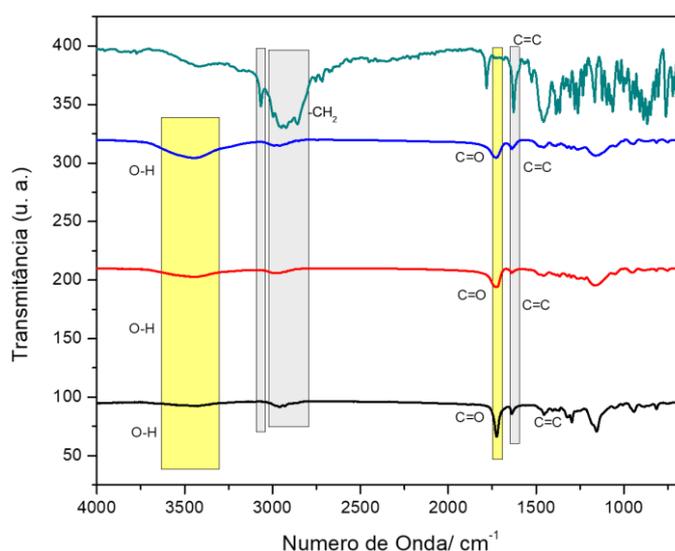


Figura 39: Espectro de IV-TF de óxido de cariofileno seus respectivos NIP, e MIP's depois da extração de antes da extração.

Foi observado nos espectros do NIP e MIP's antes e depois da extração a presença de estiramentos característicos dos grupos funcionais do polímero do ácido metacrílico, 3200-3400 cm^{-1} região de OH e em 1730 cm^{-1} referente ao grupo carboxila (C=O) do ácido carboxílico, mostrando que a síntese ocorreu como o esperado.

Na figura 40 é apresentada os espectros referentes aos MIP's antes e depois da extração. Na região demarcada, entre 1500 cm^{-1} e 700 cm^{-1} do espectro do MIP antes da extração, são observadas intensas vibrações moleculares dos estiramentos característicos do óxido de cariofileno, diferentemente ao que foi observado no espectro do MIP depois da extração.

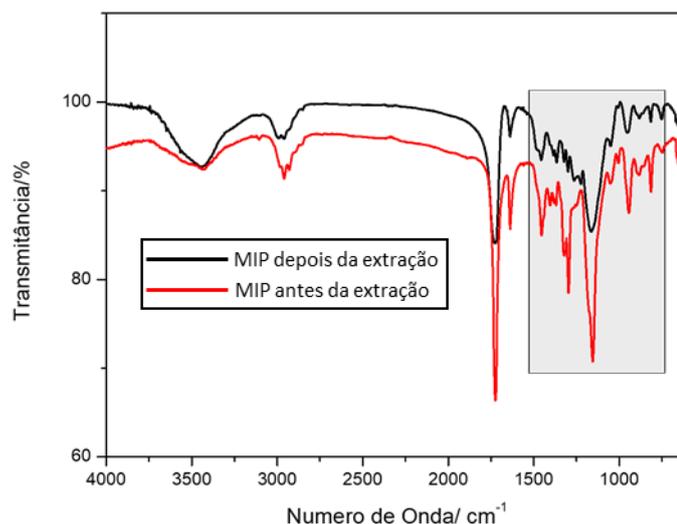


Figura 40: Espectros de IV-TF dos MIP's antes e depois da extração de óxido de cariofileno.

Estes resultados corroboram com os que foram observados nas análises de termogravimetria, para estes MIP's. Um percentual de 39% de perda de massa óxido de cariofileno, foi observado na curva TG do MIP antes da extração, e em relação a curva TG do MIP depois da extração, não foram observados traços significativos de óxido de cariofileno. Portanto, apresentando apenas vibrações moleculares relativas ao MIP depois da extração.

4.3.5 Caracterização da camada reconhecadora derivada do monômero ácido acrílico

Na Figura 41 é apresentado o espectro de IV referente ao NIP do monômero ácido acrílico. Uma proeminente banda de absorção atribuída ao estiramento OH, é observada na região 3400 cm^{-1} . E vibrações assimétricas (2961 cm^{-1}) e simétricas (2918 cm^{-1}) típicas de CH_2 , e um pequeno estiramento em 1633 cm^{-1} referente à dupla ligação ($\text{C}=\text{C}$).

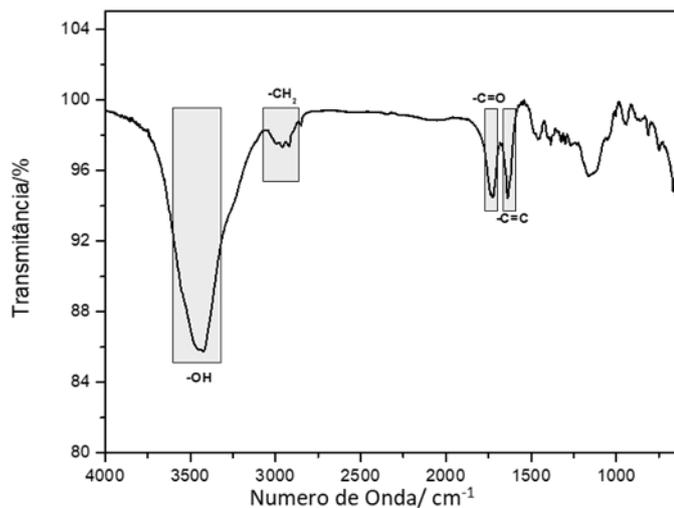


Figura 41: Espectro de IV-TF do NIP de ácido acrílico.

Em 1724 cm^{-1} é observada banda vibracional referente ao grupo carboxila ($\text{C}=\text{O}$) do ácido carboxílico, que originariamente era uma banda de estiramento a 1670 cm^{-1} . Isso é devido a variação de energia do grupo funcional, indicando o envolvimento do grupo carboxílico na formação do polímero (UMEMURA & HAYASHI, 1974; RAVICHANDRAN et. al., 2004).

Para fins de comparação, na figura 42 foram plotados os espectros de IV do óxido de cariofileno, do polímero não impresso do ácido acrílico, NIP, e dos MIP's antes e depois da extração.

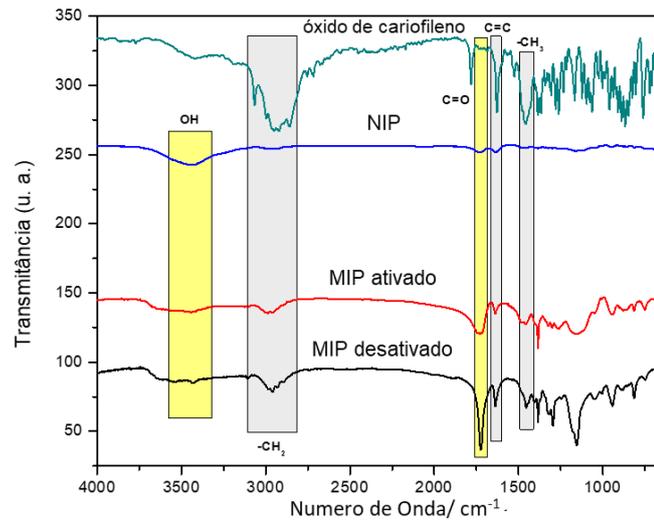


Figura 42: Espectro de IV-TF de óxido de cariofileno seus respectivos NIP, e MIP's depois da extração de antes da extração.

O MIP depois da extração e o NIP apresentam bandas de estiramentos semelhantes, pois a diferença entre os dois polímeros é a presença de sítios ativos de reconhecimento.

Contudo, ao se comparar os espectros dos MIP's antes e depois da extração, é evidente a presença de estiramentos característicos do óxido de cariofileno no seu respectivo MIP antes da extração (Figura 43).

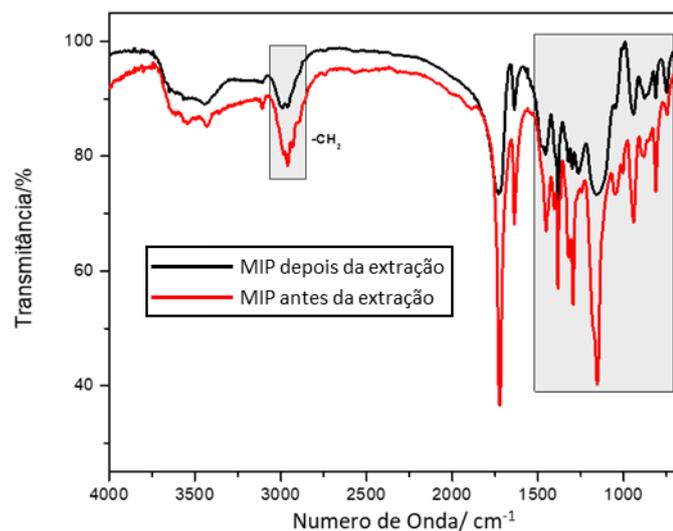


Figura 43: Espectros de IV-TF dos MIP's antes e depois da extração de óxido de cariofileno.

Observa-se no espectro do MIP depois da extração, que as bandas atribuídas à vibração de deformação axial de grupos C=C, e nas regiões de vibrações assimétricas (2936cm^{-1}) e simétricas (2859cm^{-1}) típicas de CH_2 , ocorre uma redução das vibrações nos espectros quando comparado ao espectro do MIP antes da extração. Dessa forma, confirmando os resultados obtidos pela técnica de termogravimetria, onde a curva TG do MIP antes da extração apresentou uma porcentagem de perda de massa do β -cariofileno de 57%, portanto sendo previsto vibrações moleculares bastante intensas no IV-TF do MIP antes da extração.

O resultado positivo obtido em relação a extração, está relacionado diretamente com a interação entre o óxido de cariofileno e os sítios ativos do MIP. Por ser pertencente ao grupo dos sesquiterpenos, o óxido de cariofileno apresenta estrutura química apolar, apesar de ter um grupo epóxido em seu esqueleto carbônico, dessa forma a interação que ocorre entre eles é a não covalente (Ye L et. al., 2001). Interações que se baseiam em ligações de hidrogênio, iônicas, ligações π - π , interações dipolo-dipolo, etc. (Ye L. & MOSBACH 2008).

Apesar de não apresentar em sua estrutura grupos funcionais específicos, como carboxila ou hidroxilas, o grupo epóxido, com o par de elétrons livres do átomo de oxigênio, possibilita uma possível interação de ligação hidrogênio com os grupos funcionais dos polímeros de acrilamida, ácido acrílico e ácido metacrílico (ARSHADY & MOSBACH, 1981; SHIMA et. al., 2014). Portanto, justificando a maior dificuldade de extração do óxido de cariofileno dos respectivos polímeros (Figura 44).

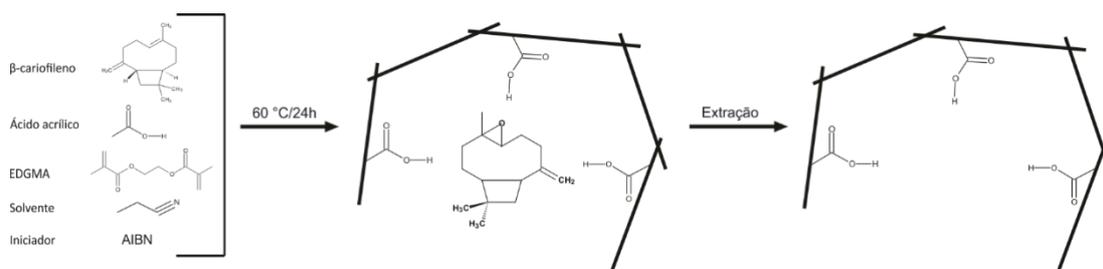


Figura 44: Esquema de síntese e interação do óxido de cariofileno com MIP.

Estes tipos de interações de moléculas terpênicas ou apolares já foram descritos na literatura, Asasuna et. al., (2004) observaram que a interação do polímero molecularmente impresso com molécula dioxina era do tipo hidrofóbica. Chen et. al., (2014), estudando a detecção do terpeno α -pineno, sugeriu que forças fracas de Van Der Waals são a principal força de ligação entre o monoterpene, α -pineno, e a matriz polimérica.

4.4 - Caracterização eletroquímica do sensor para óxido de cariofileno

4.4.1 - Estudo do comportamento dos eletrodos modificados

Inicialmente foi realizada a caracterização voltamétrica dos eletrodos modificados com o objetivo de estudar a interação do analito com os polímeros NIP e MIP's. Desta forma, foram fabricados eletrodos modificados à base de pasta de carbono com diferentes composições, um tipo de eletrodo contendo a mistura de pasta de carbono e NIP, e um tipo de eletrodo contendo pasta de carbono e MIP depois da extração da respectiva molécula molde, óxido de cariofileno.

A partir dos resultados obtidos das técnicas de IV-TF e TGA, foi possível selecionar o MIP derivado do monômero ácido acrílico, que apresentou melhor resultado após a extração do óxido de cariofileno. Dessa forma apresentando maior quantidade de cavidades poliméricas vazias.

As medidas eletroquímicas foram realizadas com método de detecção indireta, medindo a resposta eletroquímica da solução do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, pelas características apolares da molécula de óxido de cariofileno, Figura 45.

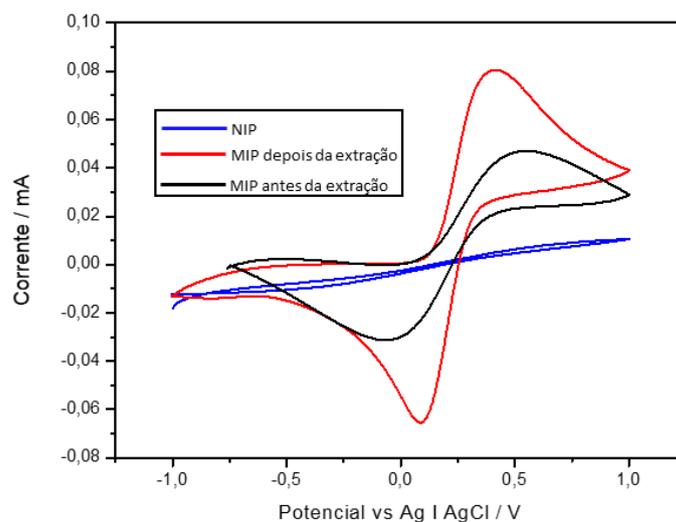


Figura 45: Voltamogramas dos eletrodos NIP, MIP antes e depois da extração.

A Figura 45 mostra que o voltamograma relacionado com o eletrodo NIP não apresentou o perfil característico do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Esta resposta foi observada e reportada anteriormente no estudo comparativo da Figura 26. Contudo, o voltamograma do eletrodo modificado com MIP depois da extração, apresentou as características do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, fornecendo os sítios ativos fundamentais para a difusão das espécies e as reações de transferência de elétrons sobre a superfície do eletrodo (TARLEY et al., 2005).

Devido a diferença entre NIP e MIP estar na presença da molécula molde na mistura reacional de polimerização, esta inserção cria “impressões” tridimensionais na estrutura polimérica. No caso do polímero NIP, este é sintetizado através de mecanismo de condensação radicalar com a formação de estruturas não porosas sem cavidades, através das quais possam ocorrer o processo de difusão do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. A morfologia das estruturas de NIP e MIP pode ser observada nas imagens de MEV da Figura 32.

Contudo, o voltamograma do eletrodo modificado MIP depois da extração, apresentou as características do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, fornecendo os sítios ativos

fundamentais para a difusão das espécies e as reações de transferência de elétrons sobre a superfície do eletrodo (TARLEY, et. al., 2005).

4.4.2 - Detecção do óxido de cariofileno e curva de calibração

O processo de reconhecimento do óxido de cariofileno foi realizado ao colocar o eletrodo de pasta de carbono modificado com MIP depois da extração em contato com soluções de óxido de diferentes concentrações. Na Figura 46, é apresentada os voltamogramas de onda quadrada (VOQ) resultantes da detecção íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, correspondentes a concentração do analito.

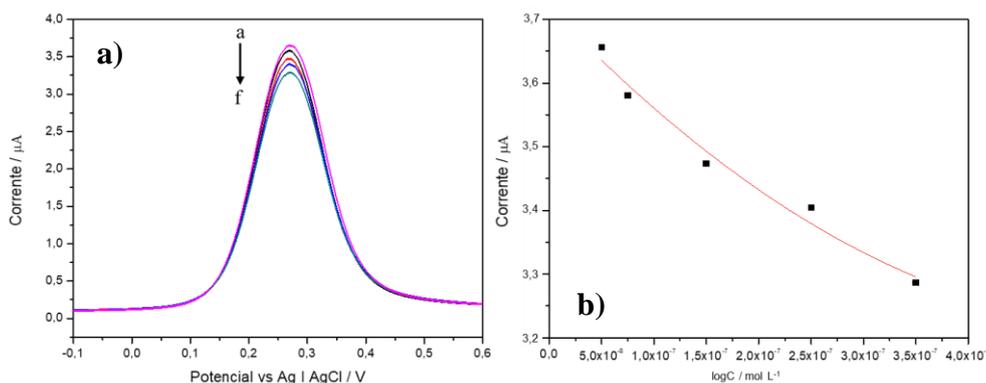


Figura 46: a) VOQ do eletrodo MIP depois da extração em diferentes concentrações de β -cariofileno. Faixa de concentrações de óxido de cariofileno utilizadas, a – f: $3,5 \times 10^{-8}$, 5×10^{-8} , $7,5 \times 10^{-8}$, $1,5 \times 10^{-7}$, $2,5 \times 10^{-7}$ e $3,5 \times 10^{-7}$ M, respectivamente. A relação linear entre a corrente de pico e a concentração de óxido de cariofileno na faixa de $3,5 \times 10^{-8}$ - $3,5 \times 10^{-7}$ M.

A Figura 46 mostra que na medida que as concentrações das soluções de óxido de cariofileno aumentam, ocorre uma diminuição nos valores de correntes nos picos anódicos. Esta resposta está relacionada com o progressivo incremento na ocupação das cavidades do MIP pela incorporação da molécula de óxido de cariofileno que limitam a difusão do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Foram plotados os valores de corrente de pico versus ao logaritmo da concentração e obtida a equação de regressão linear para $i_p (\mu\text{A}) = 0,017 \log$

$C + 0,072$ com $R^2 = 0,9828$, Figura 46b. O limite de detecção do eletrodo foi de $0,42 \mu\text{g/L}$.

Como indicado anteriormente para o sensor para β -cariofileno a diminuição dos valores de corrente foi reportada em diferentes estudos utilizando diversos. Wu et al., (2010), utilizam poliacrilamida, e Luo et al., (2014) polímeros com dopamina para a detecção de hemoglobina, correlacionam o aumento da concentração da proteína com a diminuição da corrente de pico do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

4.4.3 - Teste de detecção do óxido de cariofileno em amostra de Copaíba

Para os testes de detecção do óxido de cariofileno em amostra de óleo de copaíba foram utilizadas amostras de óleo de copaíba disponibilizadas pelo Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior.

Foram preparadas duas soluções deste óleo copaíba, 1×10^{-7} e 3×10^{-7} mol/L, e posteriormente realizadas as medidas eletroquímicas em triplicata para cada concentração, com a técnica de VOQ, utilizando o mesmo procedimento realizado na determinação da curva de calibração das soluções de óxido de cariofileno. Os resultados das medidas em óleo de copaíba, foram adicionados no resultado da curva de calibração obtida para o óxido de cariofileno, como pode ser observado na figura 47 abaixo.

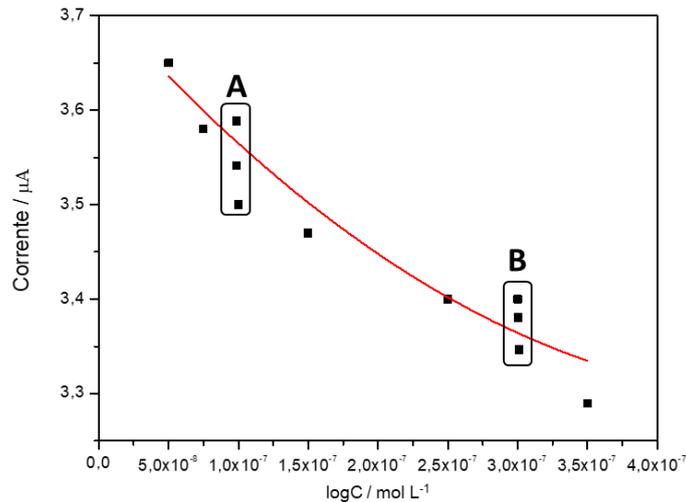


Figura 47: Aplicação real: testes de detecção do óxido de cariofileno em amostra de óleo de copaíba *in natura*. A - Triplicata da concentração de 1×10^{-7} mol/L; B – Triplicata da concentração de $3,5 \times 10^{-7}$ mol/L.

Como foi observado na Figura 47, as correntes de picos correspondentes à concentração 1×10^{-7} mol/L, apresentaram valores de correntes próximos ao que foi encontrado para a solução $1,5 \times 10^{-7}$ mol/L de óxido de cariofileno, e as respostas dos picos correntes referente à solução $3,5 \times 10^{-7}$ mol/L de copaíba, exibiram valores de correntes aproximados ao observado na concentração $2,5 \times 10^{-7}$ mol/L da solução de óxido de cariofileno.

Estes resultados mostra a possibilidade de aplicação do sensor para o óxido de cariofileno em amostras de óleo de copaíba.

CAPÍTULO V – SENSOR PARA O ADULTERANTE

5.1 - Estudos sobre detecção de adulterante

O óleo de soja constitui um dos principais adulterantes encontrado nos óleos de copaíba, por ser entre as oleaginosas produzidas no Brasil, o mais produzido e consumido, apresenta também o mais baixo preço de mercado (CONAB, 2018).

Os resultados obtidos com os polímeros impressos para a detecção dos sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno, são de grande importância para a padronização dos óleos de copaíba por serem considerados marcadores químicos destes óleos, porém para uma qualificação integral dos óleos de copaíba é importante a detecção do óleo de soja utilizado amplamente como adulterante.

O óleo de soja é constituído majoritariamente por triglicerídeos, formados por três moléculas de ácidos graxos ligadas ao glicerol. Além dos triglicerídeos, os óleos vegetais apresentam em sua composição quantidades apreciáveis de ácidos graxos livres, decorrentes dos processos de extração (CAHOON & SCHMID, 2008)

A partir do conhecimento da composição do óleo de soja, principal adulterante do óleo de copaíba, foi proposto o desenvolvimento de um sensor eletroquímico baseado em polianilina como estrutura de reconhecimento. Este sensor foi desenvolvido através da eletropolimerização de uma camada de polianilina sobre os eletrodos comerciais de ouro.

5.2 - Caracterização morfológica da PANI

A Figura 8 apresenta a imagem obtida por MEV do filme de PANI obtido após a eletropolimerização do monômero anilina. É possível observar nestas imagens uma estrutura fibrilar, nas quais as fibras estão distribuídas aleatoriamente e entrelaçadas, formando uma rede reticulada tridimensional.

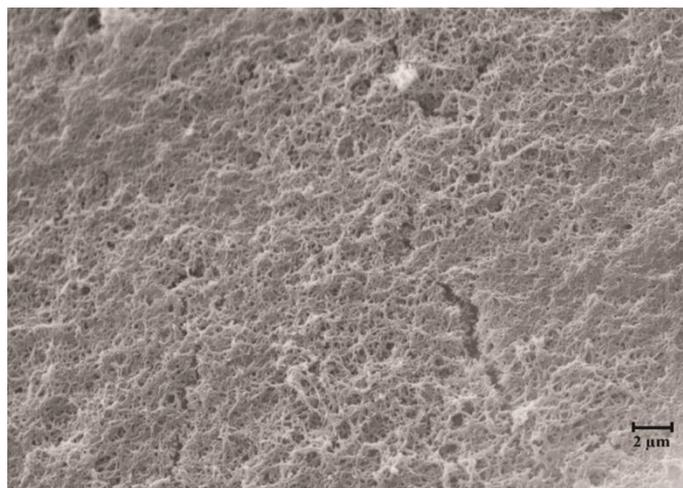


Figura 48: Imagem de microscopia eletrônica de varredura do filme de PANI (aumento de 5.000 vezes).

Espera-se que esta morfologia porosa, onde o entrelaçamento das fibras deixa espaços vazios com uma elevada área superficial, facilite o acesso dos íons ao eletrodo PANI, ocorrendo uma melhor troca de carga durante os processos redox (MORAES et al., 2004; SHAN et al., 2008; BURON et al., 2011).

5.3 - Estudos de caracterização eletroquímica da PANI

As sínteses dos filmes de PANI foram realizadas pelo método potenciodinâmico, que o crescimento do filme por repetidas varreduras do potencial na região de oxidação do monômero. A eletropolimerização por voltametria cíclica apresentou boa reprodutibilidade, rápida síntese e resultou em um filme com boa aderência à superfície do eletrodo, como descrito na literatura (GENIES et. al., 1990; MATTOSO, 1995; HU & LIN, 2002).

Na Figura 49 são apresentados os voltamogramas referentes aos 10 ciclos iniciais das sínteses dos filmes de PANI depositados sobre o eletrodo de Au, e para fins de comparação, os voltamogramas foram apresentados separadamente.

É possível observar no primeiro ciclo que até aproximadamente 0,8 V não é detectada corrente anódica, e logo após é possível observar proeminente aumento, que corresponde ao início das sucessivas reações de oxidação da anilina.

Em seguida, no sentido catódico, há uma mudança na resposta da corrente da curva voltamétrica, não sendo mais nula. É observado na curva inversa, que os potenciais são deslocados para valores menores, e apresentando um pequeno cruzamento de curvas (laço de nucleação).

Este cruzamento é correspondente ao mecanismo de nucleação do filme polimérico, pois como a superfície do eletrodo de trabalho é diferente do material a ser depositado, o crescimento desse material exige um gasto de energia para formação dos respectivos núcleos de crescimento (MUNFORD, 1998; RODRIGUES, 2015). E este gasto de energia é observado principalmente no primeiro ciclo de varredura, quando a superfície do ouro está livre.

Assim, a primeira curva voltamétrica, no sentido anódico, corresponde à resposta eletroquímica da superfície livre do ouro em contato com a solução eletrolítica, dando início ao crescimento dos núcleos ocasionando a mudança da superfície de ouro para PANI.

Essa diminuição do potencial de oxidação é devido ao aumento do comprimento da cadeia polimérica, pois a deposição dos filmes se desenvolve por sucessivas etapas eletroquímicas, onde cada etapa possui um potencial de ativação/oxidação diferente. Necessitando que o potencial de oxidação dos monômeros diminua para que o processo de polimerização continue. Dessa forma, deslocando a curva de varredura inversa para potenciais menores (VOROTYNTSEV et. al., 2010).

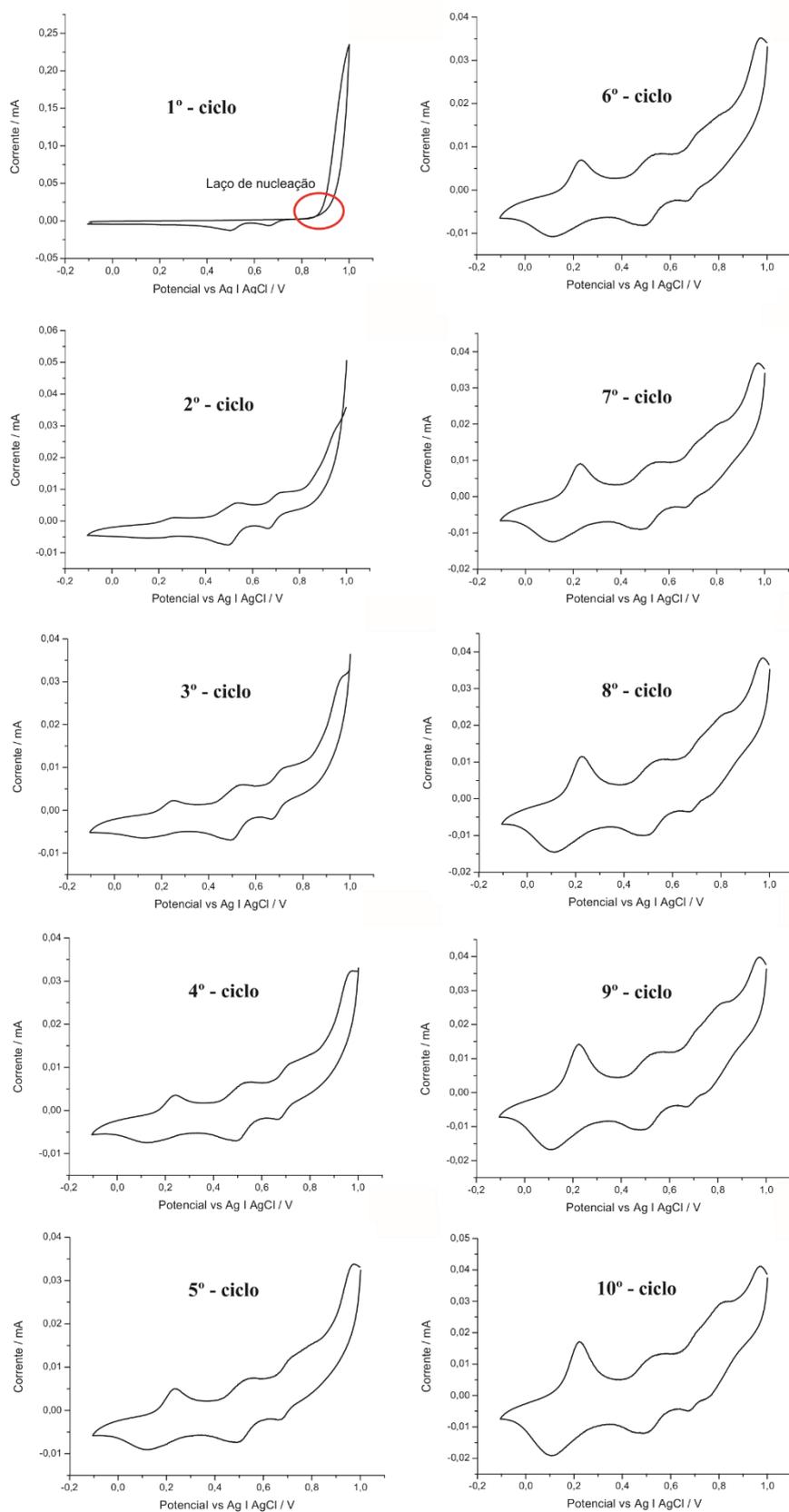


Figura 49: Voltamogramas cíclicos dos 10 primeiros ciclos do processo de polimerização do filme de PANI.

No segundo ciclo de varredura, o laço de nucleação não está mais presente, e partir deste ciclo inicia-se um aumento de corrente a cada ciclo, sinalizando o crescimento do filme condutor.

Os pares redox correspondentes à resposta eletroquímica do filme de PANI depositado sobre o ouro, começam a serem visíveis a partir do quinto ciclo, nas regiões próximas de 0,1 V e 0,7 V, indicando que a camada de ouro foi uniformemente recoberta com o filme de PANI.

A caracterização da polianilina por via eletroquímica é bem descrita na literatura (HU & LIN, 2002; ROHOM et. al., 2014), e na Figura 50 é apresentado o voltamograma característico da PANI na forma de sal de esmeraldina. Após 30 ciclos de varredura são observados os 3 picos característicos dos processos redox que ocorrem na eletropolimerização da PANI.

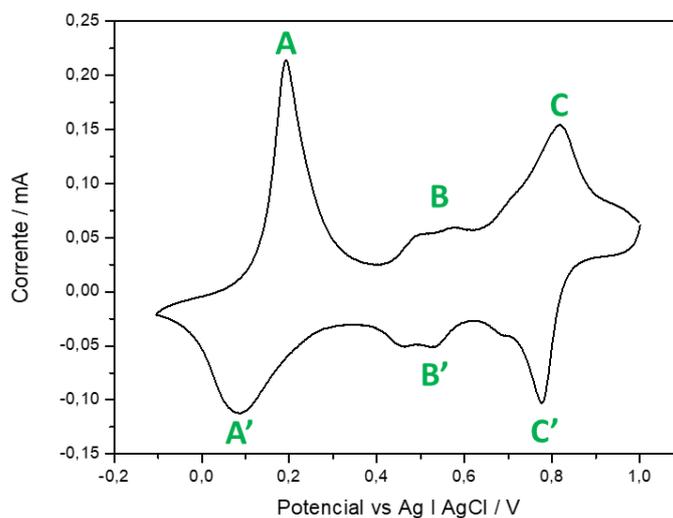


Figura 50: Voltamograma cíclico típico de polianilina (sal de esmeraldina).

Os três pares redox do processo de polimerização estão de concordância com os resultados da literatura: o par redox A/A', entre os potenciais 0,19 V e 0,08 V, é atribuído às reações de oxidação/redução da base leucoesmeraldina para o sal esmeraldina.

Verifica-se nesse primeiro processo de oxidação, anódico, que há um pequeno deslocamento de potencial entre quinto ciclo e último ciclo, 0,23 V e 0,19 V, respectivamente. Tal deslocamento relatado como o produto da formação de oligômeros, podendo ficar na matriz polimérica e gerar diminuição de condutividade (WIDERA et. al., 1997; STEJSKAL et. al., 2010; BURON et. al., 2011), porém essa diminuição de corrente não é observada, pois a cada varredura de ciclo subsequente, os valores de corrente da PANI aumentam (Figura 51).

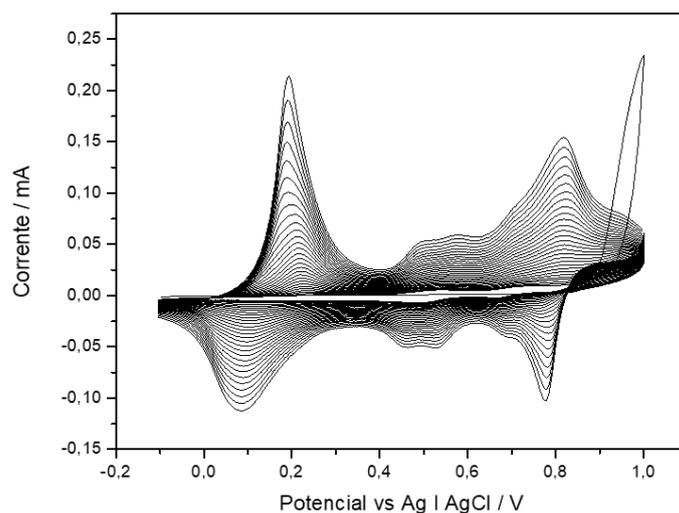


Figura 51: Voltametria cíclica dos crescimentos poliméricos.

O segundo pico, B/B', é decorrente da hidrólise do dímero 4-aminodifenilamina (ADPA), que, quando em estado oxidado, sofre duas hidrólises sucessivas: primeiro a 4-hidroxidifenilamina, e depois aos produtos finais benzoquinona/hidroquinona e anilina. (ADPA) (KOBAYASHI, et. al., 1984; DUIC et al., 1995; MATSUSHITA et. al., 2005). Esse processo é descrito como a degradação polimérica das reações entre radicais gerados na primeira oxidação, que apresentam ligações cabeça-cabeça e cabeça-cauda (MATSUSHITA et. al., 2005).

E o terceiro par redox C/C' correspondente às reações de oxidação/redução entre o sal esmeraldina e o sal pernigranilina (GENIES, et. al., 1988; MATTOSO, 1995; HU & LIN, 2002; LI, et al., 2009).

5.4 - Estudos sobre resposta eletroquímica do sensor para detecção de adulterante

Na Figura 52 é mostrado a sobreposição dos voltamogramas referentes às medidas dos perfis eletrolíticos dos eletrodos Screen Printed de ouro com e sem a polianilina. É observado neste voltamograma, a diminuição de corrente dos potenciais de oxidação e redução (0,26 V e -0,06 V, respectivamente) referentes ao eletrólito NaOH, quando o eletrodo de trabalho está funcionalizado com a PANI.

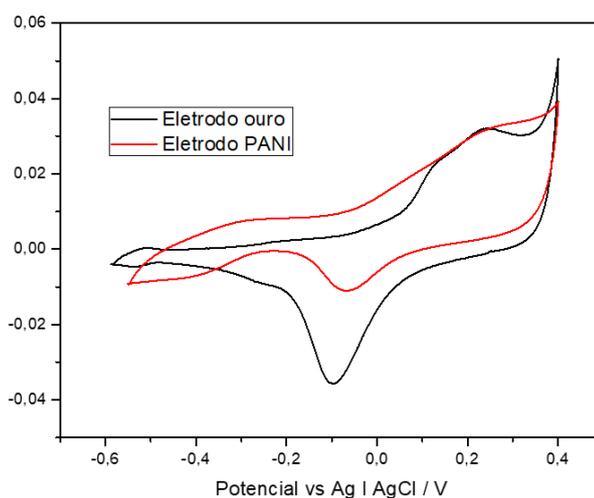


Figura 52: Sobreposição dos perfis voltamétricos dos eletrodos de ouro com e sem PANI imersos em solução NaOH 5 mol/L.

Após verificar as diferenças entre os perfis voltamétricos dos eletrodos com e sem a PANI, foi realizado a medida eletroquímica do eletrodo PANI imerso em solução de NaOH com óleo de soja (adulterante), figura 53.

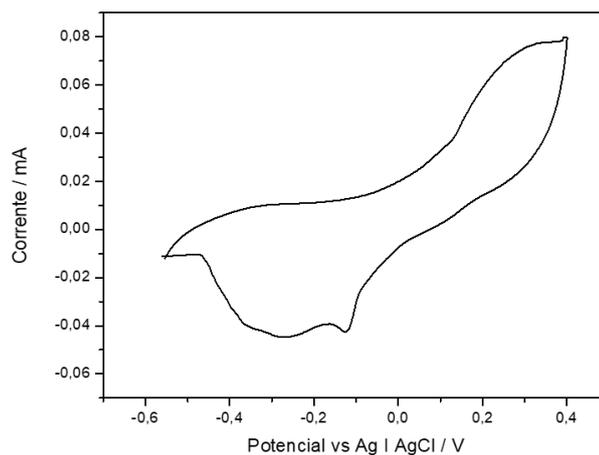


Figura 53: Perfil voltamétrico do eletrodo PANI imergido na mistura NaOH e óleo de soja.

É observado neste voltamograma, um elevado aumento de corrente na região anódica, entre -0,15 V e 0,38 V, o surgimento de um processo de redução entre -0,4 V e 0,2V.

Na sobreposição dos voltamogramas referentes aos perfis dos eletrodos dos eletrodos PANI em NaOH e na mistura NaOH e óleo de soja (Figura 54), é possível observar de forma mais clara o aumento da corrente anódica, e o surgimento do processo de redução no perfil voltamétrico do eletrodo PANI imerso na mistura de óleo de soja e solução de NaOH.

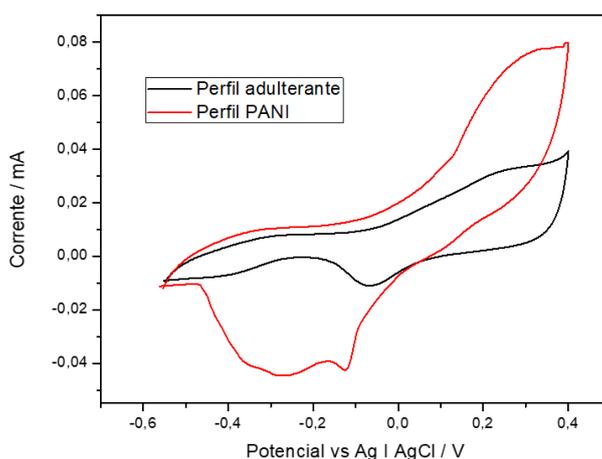


Figura 54: Sobreposição dos perfis voltamétricos dos eletrodos PANI imersos em solução NaOH 5 mol/L e na adição de óleo de soja na solução NaOH 5 mol/L.

A interação mecânica em relação aos processos eletroquímicos da polianilina com óleo de soja estão relacionados com a dopagem secundária que alguns polímeros condutores realizam, inclusive a PANI (MACDIARMID & EPSTEIN, 1994; MACDIARMID & EPSTEIN, 1995).

Esta segunda dopagem é uma combinação de um ácido orgânico funcionalizado e um solvente ideal que promove uma mudança conformacional nas cadeias poliméricas, passando de enoveladas para estendidas. Acarretando um aumento de condutividade do polímero (PYUN & MATYJASZEWSKI, 2001).

Os polímeros condutores que sofrem a segunda dopagem são utilizados de diversas maneiras, sendo que a principal forma é a de realizar troca iônica, que consiste em um processo onde o íon presente na fase aquosa é capturado sobre a superfície de um trocador iônico, no qual podem ser naturais ou sintéticos (ZORNITTA et. al., 2014).

Filmes de polipirrol, trocador iônico, foram utilizados na incorporação de íons de metais pesados Pb^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} , utilizando a técnica de microbalança eletroquímica de cristal de quartzo, e perceberam que cátions podiam ser incorporados ao polipirrol durante a aplicação de um potencial negativo (HEPEL & DENTRONE, 1996).

Polianilinas auto-dopadas, que apresentam grupos funcionais aniogênicos, são capazes de interagir com os átomos de nitrogênio positivamente carregados presentes na estrutura da PANI, ocasionando diferentes efeitos daqueles apresentados por polímeros dopados com ânions em solução (MALINAUSKAS & HOLZE, 1998).

Essas são muito utilizadas em baterias secundárias de lítio, empregando o polímero no cátodo, e sendo feito processo de compensação de cargas (VARELA, et. al., 2002). E sendo realizados estudo sobre os fenômenos relacionados ao processo redox da PANI na compensação de cargas (MALINAUSKAS & HOLZE, 1998; VARELA & TORRESI, 2000; VARELA et. al., 2000).

Além de grupos sulfonados com ácido benzoilsulfônico (PABSAH) e ácido propil-benzenossulfônico (PAPBSAH) (LIN & CHEN, 2000; HWA et. al., 2000), outros grupos, como metóxi e etóxi, são adicionados à cadeia da PANI (GAZOTTI JR et. al., 1996; GAZOTTI et. al., 1997; STROUNINA et. al., 1997).

Dessa forma, acredita-se que o processo realizado no eletrodo PANI do presente trabalho, seja a incorporação da cadeia aniônica do ácido graxo à cadeia polimérica da PANI, através do processo de quebra que os triglicerídeos presentes no adulterantes, sofrem ao serem adicionados na solução de NaOH da análise. Portanto, aumentando a quantidade de ácidos graxos no óleo de soja, ocasionando processo de compensação de cargas com a PANI.

Posteriormente, foi realizada a medida eletroquímica para a obtenção do perfil voltamétrico do eletrodo PANI imerso em solução de NaOH 5 mol/L com adição de óleo de copaíba. Na figura 55 abaixo, são apresentados os perfis voltamétricos dos eletrodos PANI imersos nas soluções NaOH 5 mol/L com óleo de copaíba e na ausência de copaíba.

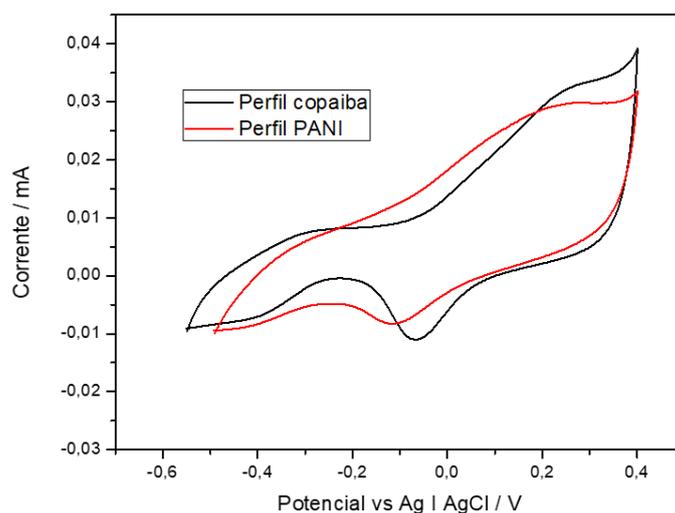


Figura 55: Sobreposição dos perfis voltamétricos dos eletrodos PANI imersos em solução NaOH 5 mol/L, e após adição de copaíba na solução NaOH 5 mol/L.

Observa-se que o perfil referente ao eletrodo PANI imerso após a adição de copaíba na solução NaOH 5 mol/L, apresentou uma varredura semelhante ao perfil do

eletrodo PANI em solução NaOH 5 mol/L, com pequeno deslocamento do potencial de redução da solução eletrolítica, e menor valor de corrente. E não apresentando novos potenciais de oxidação e redução.

Como se trata de uma óleoresina, mistura terpênica de sesquiterpenos e ácidos terpênicos, (SIMÕES et al., 1999; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002), a copaíba não apresenta substâncias com eletroatividades suficientes para sofrer os processos de oxidação e redução eletroquímica de forma simples.

Outra característica importante observada nos óleos de copaíba, é a não presença de óleos graxos em sua composição. E isso está relacionado com a biossíntese dessas duas classes de compostos, terpenos e ácidos graxos.

Estes dois compostos são conhecidos como metabólitos especiais, e apresentam rota biossintética inicial semelhante, oriundas do ácido acético, na forma ativada de acetil-SCoA. Porém, a partir deste composto depois da extração, as vias de síntese do ácido graxo e dos terpenos são diferentes, como ilustrado na Figura 56. A rota de síntese dos ácidos graxos passa por uma série de reações de condensações de Claisen entre duas unidades de carbono derivado do acetil-SCoA, resultando em cadeias poliacetilênicas, que após sofrer uma reação redução forma os ácidos graxos (DEWICK, 2002).

E os terpenóides, especificamente os sesquiterpenos, seguem a via do ácido mevalônico, que é a condensação de duas unidades de acetil-SCoA. Essa condensação ocorre de modo semelhante a uma condensação de Claisen, que em seguida passam por reações de condensação aldólicas, e posteriormente sofrem uma reação de redução com NADPH, dando origem ao ácido mevalônico (MVA) o qual é fosforilado (DEWICK, 2002; LOBO e LOURENÇO, 2007).

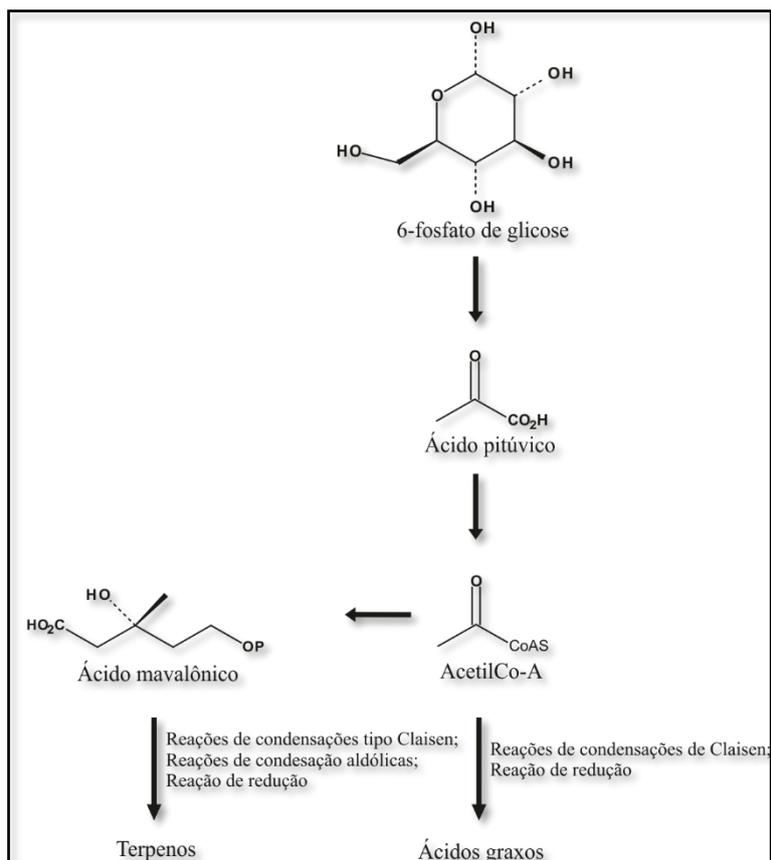


Figura 56: Biossíntese dos terpenos e ácido graxos (adaptado de DEWICK, 2002).

E quando se compara as varreduras cíclicas (Figura 57) dos eletrodos imersos em óleo de soja e em copaíba, observa-se uma importante discrepância entre os perfis voltamétricos nas regiões anódica (-0,15 V e 0,38 V) e catódica (-0,4 V e 0,2V).

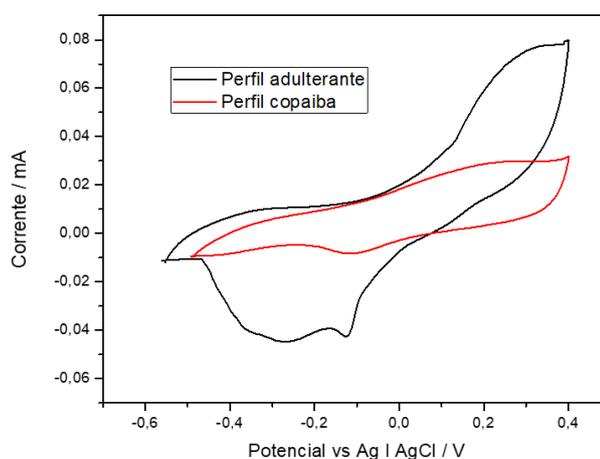


Figura 57: Sobreposição dos perfis voltamétricos dos eletrodos PANI imersos em solução NaOH 5 mol/L após adição de copaíba e óleo de soja.

Essas diferenças estão relacionadas diretamente com as composições químicas de cada óleo, pois como relatado anteriormente, os óleos de copaíba apresentam em sua biossíntese uma rota sintética diferente a dos óleos de soja. E quando os óleos de soja entram em contato com a solução de NaOH, ocorre a “quebra” dos triglicerídeos, formando ácidos graxos, contribuindo para o aumento da quantidade de ácidos graxos presentes nos óleos de soja, assim tornando-os negativos, e acabam se incorporando à cadeia polimérica da PANI.

A Figura 58 apresenta a sobreposição dos perfis voltamétricos do adulterante e da copaíba adulterada. Observa-se que o perfil do adulterante se repete quando é realizada a mesma medida com a copaíba adulterada, porém, na região onde ocorre a reação do adulterante com a PANI, há um pequeno deslocamento de potencial que pode ter ocorrido pelo fato de ser uma mistura.

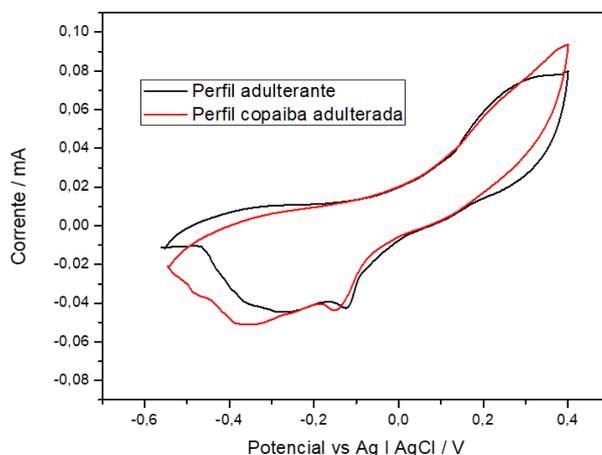


Figura 58: Sobreposição dos perfis voltamétricos do adulterante e da copaíba adulterada.

Dessa forma, comprovando o funcionamento do eletrodo screen printed funcionalizado com PANI na detecção dos triglicerídeos e ácidos graxos no óleo de copaíba.

5.5 - Detecção do adulterante

De modo a avaliar a resposta do sensor em função da concentração do adulterante (óleo de soja), foram realizadas medidas utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) em diferentes quantidades do adulterante (entre $1,01 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-6}$ mol⁻¹). Sendo realizado o mesmo procedimento de análise feita no tópico anterior, onde um eletrodo funcionalizado com PANI foi imergido em um frasco que continha a mistura de solução de NaOH (hidróxido de sódio) 5 mol/L e óleo de soja.

A partir da intensidade do pico catódico versus a concentração do adulterante foi construída uma curva de calibração, representada na figura 59.

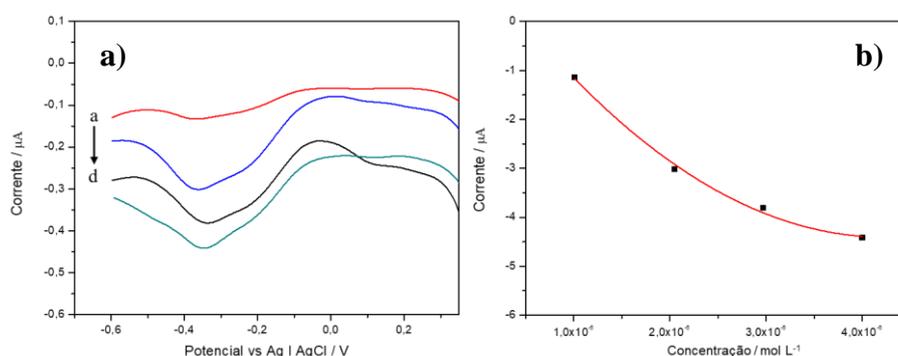


Figura 59: a) Representação da intensidade do pico em função da concentração de adulterante nas condições de análise otimizada. Faixa de concentrações do adulterante utilizadas, a – d: $1,01 \times 10^{-6}$, $2,05 \times 10^{-6}$, $2,97 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-6}$ mol⁻¹, respectivamente. b) A relação linear entre a corrente de pico e a concentração do adulterante na faixa nas respectivas concentrações utilizadas.

Como se pode verificar na figura 59 a acima, à medida que a concentração do adulterante aumenta, menor é o valor de referente a corrente catódica. E na figura 59 b é verificada que a intensidade da corrente de pico catódico e a concentração do adulterante, apresenta uma relação em função do logaritmo da concentração, apresentando uma equação de regressão linear para com um $i_p (\mu\text{A}) = 2(\mu\text{L}) \log C + 1 \times 10^{-5}$ ($R^2 = 0,9937$), e limite de detecção de $0,74 \mu\text{g/L}$.

5.6 - Teste de detecção do adulterante em amostra de óleo de Copaíba

Para a avaliação do sensor proposto para a determinação do adulterante óleo de soja, em amostra real, foram realizadas análises de VOQ no mesmo óleo de copaíba *in natura* que foi utilizado nas medidas dos eletrodos MIP's para beta e óxido de cariofileno.

Foram preparadas duas soluções de óleo de copaíba, $1,5 \times 10^{-6}$ e $2,5 \times 10^{-6}$ mol/L, e posteriormente foram realizadas as medidas eletroquímicas em triplicata, com a técnica de VOQ, utilizando o mesmo procedimento realizado na determinação da curva de calibração das soluções de óleo de soja. Os resultados das medidas em óleo de copaíba, foram adicionados no resultado da curva de calibração obtida para o adulterante, como pode ser observado na figura 60 abaixo.

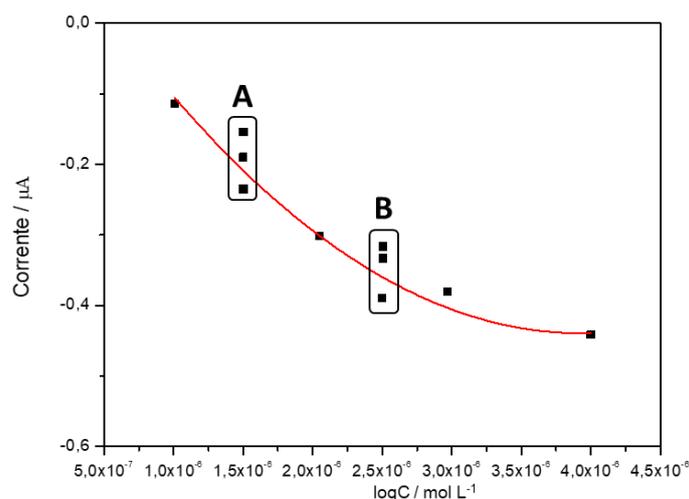


Figura 60: Aplicação real: testes de detecção do adulterante em amostra de óleo de copaíba *in natura*. A - Triplicata da concentração de $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L; B - Triplicata da concentração de $2,5 \times 10^{-6}$ mol/L.

As respostas dos sinais analíticos correspondentes à concentração $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L, apresentaram valores de correntes próximos ao que foi encontrado para a solução 2×10^{-6} mol/L do adulterante, e as respostas dos picos correntes referente à solução $2,5 \times 10^{-6}$

mol/L de copaíba, exibiram valores de correntes aproximados ao observado na concentração 3×10^{-6} mol/L da solução do adulterante.

Estes resultados, assim como os que foram observados nos sensores MIP's para beta e óxido de cariofileno, demonstram a viabilidade da aplicação do sensor para adulterante óleo de soja em amostras de óleo de copaíba.

CONCLUSÃO

Os estudos realizados por IV-TF mostraram-se de grande importância na caracterização estrutural dos polímeros NIP's e MIP's tanto para o β -cariofileno quanto para o óxido de cariofileno. Foi possível diferenciar os espectros dos polímeros antes e depois da extração das respectivas moléculas moldes, dessa forma, podendo selecionar o polímero que apresentou menores vibrações moleculares das respectivas moléculas de interesses, conseqüentemente, MIP's que apresentam cavidades tridimensionais receptivas.

Através do estudo termogravimétrico, foi possível observar a diferenciação entre as suas respectivas curvas termogravimétricas dos polímeros NIP's e MIP's, e das moléculas moldes, β -cariofileno e óxido de cariofileno. Observou-se que as curvas termogravimétricas dos NIP's e MIP's depois da extrações e antes da extrações foram semelhantes, mostrando que a síntese foi realizada com sucesso. Em relação aos MIP's depois da extrações e antes da extrações, observou-se uma importante diferença em relação as perdas de massas referentes às moléculas moldes, onde foi possível verificar, nas curvas termogravimétricas dos MIP's antes da extrações, que apresentam a molécula molde em sua estrutura, a presença da curva termogravimétrica característica da molécula molde. Dessa forma, esta técnica foi de suma importância para caracterização dos polímeros, corroborando com os resultados obtidos pela técnica espectroscópica de IV-TF.

As técnicas eletroquímicas como a VC permitiram aprofundar os mecanismos de reconhecimento molecular e as características eletroativas do β -cariofileno e óxido de cariofileno.

A detecção do β -cariofileno e óxido de cariofileno foram realizadas através da VOQ que permitiu a detecção em um intervalo de concentração entre $1,5$ e $7,5 \times 10^{-7}$ M

com o coeficiente de correlação de 0,9916, e limite de detecção 0,72 µg/L para o β-cariofileno, e um intervalo de concentração entre $3,5 \times 10^{-8}$ e $3,5 \times 10^{-7}$ M com o coeficiente de correlação de 0,9828, e limite de detecção 0,42 µg/L.

Quanto a síntese eletroquímica da PANI, foi possível caracterizá-la através da técnica de voltametria cíclica, e por essa mesma técnica observou-se, através da utilização da PANI como elemento de reconhecimento, a detecção do principal adulterante encontrado no óleo copaíba, apresentando um voltamograma característico.

A detecção do adulterante (soja) foi realizada através da VOQ que permitiu a detecção em um intervalo de concentração entre $1,01 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-6}$ M com o coeficiente de correlação de 0,9937, e limite de detecção 0,74 µg/L.

Esses resultados mostraram o grande potencial de monitoramento dos marcadores químicos da copaíba, β-cariofileno e óxido de cariofileno, e na detecção do principal adulterante encontrado nos óleos de copaíba.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KINDY, S.; BADÍA, R.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, J.L.; DÍAZ-GARCÍA, M.E.;
Molecularly Imprinted Polymers and Optical Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. Vol. 30, pag. 291-309, 2000.

ANDERSSON, L. I. Efficient sample pre-concentration of bupivacaine from human plasma by solid-phase extraction on molecularly imprinted polymers. *Analyst*. Vol. 125, pag. 1515-1517, 2000.

ANGNES L., RICHTER E.M., KUME G.H., AUGELLI M.A. Gold Electrodes from Recordable CDs. *Analytical Chemistry*. Vol. 72, pag. 5503-5506, 2000.

ARRUDA, F. F. A.; O Brasil Colonial, Ed. Ática, São Paulo, 1980

ARSHADY, R.; MOSBACH, K. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Macromol. Chem.* Vol. 182, pag. 687-692, 1981.

ARTHUR GEORGE; GREEN ALLIED EDMUND WOODHEAD. Aniline-black and allied compounds. Part II. *Journal Chemical Society, Transactions*. Vol. 101, pag. 117-1123, 1912.

ASANUMA, H.; HISHIYA, T.; KOMIYAMA, M., Efficient Separation of Hydrophobic Molecules by Molecularly Imprinted Cyclodextrin Polymers. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. Vol. 50, pag. 51-55, 2004.

BARBOSA, K. S.; YOSHIDA, M.; SCUDELLER, V. V. Detection of adulterated copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil-resins by refractive index and thin layer chromatography. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. Vol. 19, pag. 57-60, 2009.

BARBOSA, P. C. S.; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, GIL.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Influence of Abiotic Factors on the Chemical Composition of Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne): Soil Composition,

Seasonality and Diameter at Breast Height. *Journal Brazilian Chemistry Society*. Vol. 23, pag. 1823-1833, 2012.

BARBOSA, P. C. S.; WIEDEMANN, L. S. M.; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Phytochemical Fingerprints of Copaiba Oils (*Copaifera multijuga* Hayne) Determined by Multivariate Analysis. *Chemistry & biodiversity* – Vol. 10, pag. 1350-1360, 2013.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*. Vol. 32, pag. 679-688, 2009.

BATLOKWA, B. S.; MOKGADI, J.; NYOKONG, T.; TORTO, N. Optimal Template Removal from Molecularly Imprinted Polymers by Pressurized Hot Water Extraction. *Chromatographia*. Vol. 73, pag. 589–593, 2011.

BELTRAN, A.; BORRULL, F.; CORMACK, P.A.G.; MARCÉ R.M. Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 29, pag. 1363-1375, 2010.

BETATACHE, A.; LAGARDE, F.; SANGLAR, C.; BONHOMME, A.; LEONARD, D.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Gold Electrodes Modified with Molecular Imprinted Acrylate Polymer for Impedimetric Determination of Testosterone. *Sensors & Transducers*, Vol. 27, pag. 92-99, 2014.

BHADRA, S.; KHASTGIR, D.; N SINGHA, K.; LEE, J. H. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress in Polymer Science*. Vol. 34, pag. 783–810, 2009.

BIANCA L. SADICOFF, EDIMIR M. BRANDÃO E ELIZABETE F. LUCAS. Copolimerização Micelar de Poli(Acrilamida-g-Óxido de Propileno): Avaliação Reológica e Caracterização de suas Soluções. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Vol. 11, pag. 41-50, 2001.

BIAVATTI, M.W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F.C.; LIMA, M.P. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol.16, pag. 230-235, 2006.

BIÑAS, F. G.; SEVILLA, F. Molecularly imprinted potentiometric sensor for surfactant based on electrosynthesized polyaniline. *Acta Manilana*. Vol. 62, pag. 61–67, 2014.

BLANCO-LOPEZ, M.C.; LOBO-CASTANON, M.J.; MIRANDA-ORDIERES, A.J.; TUNON-BLANCO. P. Voltammetric sensor for vanillylmandelic acid based on molecularly imprinted polymer-modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 18, pag. 353-362, 2003.

BRAGA, WALDENIR F.; REZENDE, C. M.; ANTUNES, O. A. C.; PINTO, A. C. Terpenoids From Copaiba Cearensis. *Phytochemistry*, Vol. 38, pag. 263-264, 1998.

BRUNO, L. M.; PINTO, G. A. S.; CASTRO, H. F.; LIMA-FILHO, J. L. MELO, E. H. M. Variables that affect immobilization of mucor miehei lipase on nylon membrane. *World journal of microbiology & biotechnology*, v. 20, p. 371-375, 2004.

BURON, C.C.; LAKARD, B.; MONNIN, A.F.; MOUTARLIER, V.; LAKARD, S. Elaboration and characterization of polyaniline films electrodeposited on tin oxides. *Synthetic Metals*. Vol. 161, pag. 2162–2169, 2011.

BURON, C.C.; LAKARD, B.; MONNIN, A.F.; V. MOUTARLIER, LAKARD, S. Elaboration and characterization of polyaniline films electrodeposited on tin oxides. *Synthetic Metals*. Vol. 161, pag. 2162– 2169, 2011.

CAHOON, E. B.; SCHMID, K. M.; Metabolic Engineering of the Content and Fatty Acid Composition of Vegetable Oils, *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 1, pag. 161-200, 2008

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação. Resumo Executivo: Sub-rede de Dermocosméticos na Amazônia

a partir do Uso Sustentável de sua Biodiversidade com enfoques para as Cadeias Produtivas da: Castanha-do-pará e dos Óleos de Andiroba e Copaíba. Brasília, 2008.

CETINKAYA, M.; KARAOSMANOGLU, F. Optimization of Base-Catalyzed Transesterification Reaction of Used Cooking Oil. *Energy Fuels*. Vol.18, pag. 1888-1895, 2004.

CHAMBERS, J. P.; ARULANANDAM, B. P.; MATTA, L. L.; WEIS, A.; VALDES, J. J. Biosensor Recognition Elements. *Curr. Issues Mol. Biol*. Vol.10, pag. 1-12, 2008.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B.D. Mediated biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. Vol. 17, pag. 441–456, 2002.

CHEN, B.; LIU, C.; HAYASHI, K.; Selective terpene vapor detection using molecularly imprinted Polymer coated Au nanoparticle LSPR sensor. *Ieee Sensors Journal*. Vol. 14, pag. 3458-3464, 2014.

CHEN, HONG-JUN.; ZHANG, ZHAO-HUI.; CAI, R.; CHEN, X.; LIU, YU-NAN.; RAO, W.; YAO, SHOU-ZHUO. Molecularly imprinted electrochemical sensor based on amine group modified graphene covalently linked electrode for 4-nonylphenol detection. *Talanta*. Vol. 115, pag. 222–227, 2013.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J. Ethnopharmacol*. Vol. 126, pag. 159–175, 2009.

CONAB.<https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-de-conjunturas-de-soja/item/7346-soja-conjuntura-semanal-09-04-a-13-04-2018>. Acesso em: 22 de abril 2018.

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

COSNIER, S. Biosensor based on electropolymerized films: new trends. *Anal. Bioanal. Chem.* Vol. 377, pag. 507-520, 2003.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipase como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, v. 22, p. 863-873, 1999.

DA SILVA, R. A. B.; RABELO, A. C.; BOTTECCHIA, O. L.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Desenvolvimento, caracterização e aplicação eletroanalítica de um compósito fluido de adesivo epóxi, grafite e ciclo-hexanona. *Química Nova*, Vol. 33, pag. 1398-1402, 2010.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Natural products Reports*. Vol. 19, pag. 222, 2002.

DHAND, C.; SUMANA, G.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Electrophoretically deposited nano-structured polyaniline film for glucose sensing. *Thin Solid Films*. Vol. 519, pag.1145–1150, 2010.

DIMA, STEFAN-OVIDIU.; DOBRE, T.; CHETRARU, O.; NICOLAE, CRISTIAN-ANDI.; SPATARU, CATALIN-ILIE.; SARBU, A. Molecularly Imprinted Poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) Matrix With Sclareol. *Polymer engineering and science*. Vol. 54, pag. 1484-1493, 2014.

DONG, J.; OZAKI, Y. NAKASHIMA, K. Infrared, Raman, and near-infrared spectroscopic evidence for the coexistence of various hydrogen-bond forms in poly(acrylic acid). *Macromolecules*. Vol. 30, pag. 1111-1117, 1997.

DUAN, Y.; LUO, X.; QIN, Y.; ZHANG, H.; SUN, G.; SUN, X.; YAN, Y. Determination of Epigallocatechin-3-Gallate with a High-Efficiency Electrochemical Sensor Based on a Molecularly Imprinted Poly(o-phenylenediamine) Film. *Journal applied polymer science*. Pag. 2882-2890, 2013.

DUIC, L.; MANDIC, Z.; KOVAC, S. Polymer-dimer distribution in the electrochemical synthesis of polyaniline. *Electrochimica Acta*. Vol. 40, pag. 1681-1688, 1995.

E. M., GENIES; A. BOYLE; M. LAPKOWSKI; C. TSINTAVIS. POLYANILINE: A HISTORICAL SURVEY. *Synthetic Metals*. Vol. 36, pag. 139-182, 1990.

EL-SHALL, M.S.; DALY, G.M.; WRIGHT, D. Experimental and theoretical study of benzene (acetonitrile)_n clusters , n=1–4. *J. Chem. Phys.* Vol. 116, pag. 10253-10266, 2002.

F. L.; MASCARENHAS, Y. P. *Journal of Molecular Structure*, v. 1036, p. 121-126, 2013.

FABER. K.; *Biotransformations in organic Chemistry*, 4th ed., Springer – Verlag: New York, 2000.

FAO. Non-wood forest products for rural income and sustainable forestry. Rome, 1995. 127 p. (FAO Technical Papers. Series Non Wood Forest Products, 7).

FÉAS, X.; GENTE, C. A.; HOSSEINI, S. V.; SEIJAS, J. A.; VÁZQUES, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A. Use of acrylic acid in the synthesis of molecularly imprinted polymers for the analysis of cyproheptadine. *Materials Science and Engineering C*. Vol. 29, pag. 398–404, 2009.

FELIX, P. H. C.; BIRCHAL, V. S.; BOTREL, D. A.; MARQUES, G. R.; BORGES, S. V. Physicochemical and thermal stability of Microcapsules of cinnamon essential Oil by spray drying. *Journal of Food Processing and Preservation*. Vol 41, pag. 1-9, 2017.

FERNANDES, F.F.; FREITAS, E.P.S. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* Vol. 147, pag. 150–154, 2007.

FERRER, I.; LANZA, F.; TOLOKAN, A.; HORVATH, V.; SELLERGRÉN, B.; HORVAI, G.; BARCELÓ, D. Selective trace enrichment of chlorotriazine pesticides

from natural waters and sediment samples using terbuthylazine molecularly imprinted polymers. *Analytical Chemistry*. Vol. 72, pag. 3934-3941, 2000.

FUNDA KARTAL, ALI KILINÇ, SUNA TIMUR. Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* Vol. 87, Nos. 10–11, 20 August–15 September 2007, 715–722.

FURUKAWA Y.; TASUMI, M. *Modern Polymer Spectroscopy*. New York: Wiley – VCH, 1999. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527613922.fmatter/pdf>. Acesso em: 15 NOV 2008.

GAZOTTI JR, W.A.; FAEZ, R.; DE PAOLI, MARCO-A. Electrochemical, electrochromic and photoelectrochemical behavior of a highly soluble polyaniline derivative: poly(o-methoxyaniline) doped with functionalized organic acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 415, pag. 107- 113, 1996.

GAZOTTI JR, W.A.; JANNINI, M.J.D.M.; S.I, CORDOBA-TORRESI, S. I.; MARCO-A. Influence of dopant, pH and potential on the spectral changes of poly(o-methoxyaniline): relationship with the redox processes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 440, pag. 193- 199, 1997.

GENIES, E.M; LAPKOWSKI, M; PENNEAU, J.F, Cyclic Voltammetry of Polyaniline - Interpretation of the Middle Peak, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 249, pag. 97-107, 1988.

GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; CAVALCANTI, B.C.; FERREIRA, J.R.O.; ALMEIDA, F.S.; RAO, V.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; ODORICO-DE-MORAES, M.; PESSOA, C. Chemistry and pharmacology of *Copaifera langsdorffii* Desf.: An overview. In: GOVIL, J.N.; SINGH, V.K., ARUNACHALAM, C. (Org.). *Recent Progress in Medicinal Plants*. Houston: Studium Press, LLC, 2009, v. 27, cap. 13, p. 241-266, 2010.

GUPTA, K. C.; KEERTI KHANDEKAR. Temperature-Responsive Cellulose by Ceric(IV) Ion-Initiated Graft Copolymerization of N-Isopropylacrylamide. *Biomacromolecules*. Vol. 4, pag. 758-765, 2003.

H. LETHEBY. On the production of a blue substance by the electrolysis of sulfate of aniline. *Journal Chemistry Society*. Vol. 15, pag. 161-163, 1862.

HARTWIG SCHULZ; MALGORZATA BARANSKA. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. Vol. 43, pag.13–25, 2007.

HAUPT, K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *The Analyst*, Cambridge. Vol. 126, pag. 747-756, 2001.

HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers in chemical and biological sensing. *Biochemical Society Transactions*. Vol. 27, pag. 344, 1999.

HEDBORG, E.; WINQUIST, F.; LUNDSTROM, I.; ANDERSSON, L. I.; MOSBACH, K. Some studies of molecularly-imprinted polymer membranes in combination with field-effect devices *Sens. Actuators A*. Vol. 796, pag. 36-38, 1993.

HEEGER AJ. Semiconducting and Metallic Polymers: The Fourth Generation of Polymeric Materials. *The journal of physical chemistry B*. Vol. 105, pag. 8475 - 8491, 2001.

HEPEL, M.; DENTRONE, L.; Controlled Incorporation of Heavy Metals from Aqueous Solutions and Their Electorelease Using Composite Polypyrrole Films. *Electroanalysis*. Vol. 8, pag. 996-1005, 1996.

HERRERO-JÁUREGUI, C.; CASADO, M.A.; ZOGHBI, M.G.B.; MARTINS-DASILVA, R.C.V. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. *Chemistry & Biodiversity*. Vol.8, pag. 674-684, 2011.

HIJO, A. A. C. T.; COSTA, J. M. G.; SILVA, E. K.; AZEVEDO, V. M.; YOSHIDA, M. I.; BORGES, S. V. Physical and thermal properties of oregano (*origanum vulgare* l.) Essential oil microparticles. *Journal of Food Process Engineering*. Vol. 38, pag. 1–10, 2015.

HORNG, Y.; HSU, Y.; GANGULY, A.; CHEN, C.; CHEN, L.; CHEN, K. Direct-growth of polyaniline nanowires for enzyme-immobilization and glucose detection. *Electrochemistry Communications*. Vol. 11, pag. 850–853, 2009.

HU, CHI-CHANG.; LIN, JENG-YAN. Effects of the loading and polymerization temperature on the capacitive performance of polyaniline in NaNO₃. *Electrochimica Acta*. Vol. 47, pag. 4055-4067, 2002.

HU, S.; YU, J.; ZENG, E.Y. A theoretical study on UV-spectroscopy , electronic structure and reactivity properties of sesquiterpenes. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*. Vol. 10, pag. 24325-24343, 2010.

HUANG, W. S.; HUMPHREY, B. D.; MACDIARMID, A. G. Polyaniline, a Novel Conducting Polymer. *J. Chem. SOC., Faraday Trans*. Vol. 82, pag. 2385-2400, 1986.

HUANG, W. S.; MACDIARMID, A. G. *Polymer*. Vol.34, p. 1833-1845, 1993.

HWANG, C.; LEE, W. J. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods. *Chromatography, A*. Vol. 69, pag 962, 2002.

IZUMI, C. M. S. Caracterização espectroscópica da polianilina em diferentes ambientes químicos. 2006. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, JR., V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* Demonstrated in Vitro Antiparasitic and Synergic Activity. *J. Med. Chem*. Vol. 55, pag. 2994–3001, 2012.

JAIN,V.; BIESINGER, M.C.; LINFORD, M.R. The Gaussian-Lorentzian Sum, Product,

and Convolution (Voigt) functions in the context of peak fitting X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) narrow scans. *Appl. Surf. Sci.* Vol. 447, pag. 548–553, 2018.

JUAN-CARLOS VIDAL, ESPERANZA GARCIA-RUIZ, AND JUAN-RAMÓN CASTILLO. Recent Advances in Electropolymerized Conducting Polymers in Amperometric Biosensors. *Microchim. Acta.* Vol. 143, pag. 93–111, 2003.

KAMILLA DA MATA; MARCELA ZANETTI CORAZZA; FERNANDA MIDORI DE OLIVEIRA; ANA LÚCIA DE TOFFOLI; CÉSAR RICARDO TEIXEIRA TARLEY; ALTAIR BENEDITO MOREIRA. Synthesis and characterization of cross-linked molecularly imprinted polyacrylamide for the extraction/preconcentration of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from water samples. *Reactive & Functional Polymers.* VOL. 83, pag. 76-83, 2014.

KAN, X.; XING, Z.; ZHU, A.; ZHAO, Z.; XU, G.; LI, C.; ZHOU, H. Molecularly imprinted polymers based electrochemical sensor for bovine hemoglobin recognition. *Sensors and Actuators B.* Vol. 168, pag. 395– 401, 2012.

KHADRO, B.; SANGLAR, C.; BONHOMME, A.; ERRACHID, A.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Molecularly imprinted polymers (MIP) based electrochemical sensor for detection of urea and creatinine *Proc. Eng.* Vol. 5, pag. 371-374, 2010.

KOBAYASHI, T.; YONEYAMA, H.; TAMURA, H. Electrochemical Reactions Concerned With Electrochromism Of Polyaniline Film-Coated Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* Vol. 177, pag. 281-291, 1984.

KOSTER, E. H. M.; CRESCENZI, C.; HOEDT, W.; ENSING, K.; JONG, G. J. Fibers Coated with Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Microextraction *Anal. Chem.* 73, 3140, 2001.

LAMEIRA, O.A.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; ZOGHBI, M.G.B.; OLIVEIRA, E.C.P. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the State of Pará, Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, Vol.21, pag.105-107, 2009.

LEANDRO, L. M., VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from *Copaiba* (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Molecules*. Vol. 17, pag. 3866-3889, 2012.

LEE, Jeong-O; So, HYE-MI; JEON, EUN-KYOUNG; CHANG, H; WON, K.; KIM, Y. H. Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors. *Anal Bioanal Chem*, Vol.390, pag.1023-1032, 2008.

LEE, S.; DOONG, R. Adsorption and selective recognition of 17 β -estradiol by molecularly imprinted polymers. *Journal of Polymer Research*, Vol. 19, pag. 1–12, 2012.

LI, H.L.; et al., Theoretical and experimental specific capacitance of polyaniline in sulfuric acid, *Journal of Power Sources*. Vol. 190, pag. 578-586, 2009.

LIMA, C.S.; MEDEIROS, B.J.L.; FAVACHO, H.A.S.; SANTOS, K.C.; OLIVEIRA, B.R.; TAGLIALEGNA, J.C.; COSTA, E.V.M.; CAMPOS, K.J.; CARVALHO, J.C.T. Pré-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). *Phytomedicine*. Vol. 18, pag. 1013–1023, 2011.

LIMA, S.R.M.; VEIGA, V.F., JR.; CHRISTO, H.B.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytotherapy Research*, Vol.17, pag.1048–1053, 2003.

LIU, H.; YANG, G.; TANG, Y.; CAO, D.; QI, T.; QI, Y.; FAN G. Physicochemical characterization and pharmacokinetics evaluation of β -caryophyllene/ β -cyclodextrin inclusion complex. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 450, pag. 304– 310, 2013.

- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. *Biossíntese de produtos naturais*. Editora IST Press, 2007. 261p.
- LOUETTE, P.; BODINO, F.; PIREAUX, J. Poly(acrylic acid) (PAA) XPS Reference Core Level and Energy Loss Spectr. Vol. 12, pag. 22-26, 2005.
- LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Química Nova*, Vol. 29, pag. 1318-1325, 2006.
- LUCA, G. C.; REIS, B. F. Sistema em fluxo para determinação espectrofotométrica de uréia em plasma de sangue animal empregando leguminosa como fonte natural da enzima urease. *Química Nova*, Vol. 24, pag. 191, 2001.
- LUO, J.; JIANG, S.; LIU, X. Electrochemical sensor for bovine hemoglobin based on a novel graphene-molecular imprinted polymers composite as recognition elemento. *Sensors and Actuators B*. Vol. 203, pag. 782–789, 2014.
- MACDIARMID, A. G.; “Synthetic Metals”: A Novel Role for Organic Polymers (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001
- MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J. Polyanilines – A novel class of conducting polymers. *J. Faraday Disc. Chem. Soc.* Vol. 88, pag. 317-332, 1989.
- MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J. Secondary doping in polyaniline. *Synth. Met.* Vol. 69, pag. 85-92, 1995.
- MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J. The concept of secondary doping as applied to polyaniline. *Synth. Met.* Vol. 65, pag. 103-116, 1994.
- MACDIARMID, A.G.; A EPSTEIN, J. The concept of secondary doping as applied to polyaniline. *Synthetic Metals*. Vol. 65, pag. 103-116, 1994.
- MAHAJAN, J.R.; FERREIRA, G.A.L. New diterpenoids from copaiba oil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Vol.43, pag. 611–613, 1971.

MALINAUSKAS, A.; HOLZE, R.; Suppression of the “first cycle effect” in self-doped polyaniline. *Electrochim. Acta*. Vol. 43, pag. 515-520, 1998.

MARESTONI, L. D.; WONG, A.; FELICIANO, G. T.; MARCHI, M. R.R.; TARLEY, C. R.T.; SOTOMAYOR, M. P. T. Optimization and Application of Imprinted Poly(AA-EGDMA) for Solid Phase Extraction of Ciprofloxacin in Artificial Urine. *Current Drug Therapy*. Vol. 9, pag. 270-276, 2014.

MAROM, N.; TKATCHENKO, A.; ROSSI, M.; GOBRE, V. V.; HOD, O.; SCHE, M.; KRONIK, L. Dispersion Interactions with Density-Functional Theory : Benchmarking Semiempirical and Interatomic Pairwise Corrected Density Functionals, Vol. 7, pag. 3944–3951, 2011.

MARQUES, P.R.B.O.; YAMANAKA, H. (2008) Biossensores Baseados no processo de inibição enzimática. *Química Nova*, Vol. 31, pag.1791-1799.

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 & Functional Polymers*. Vol. 83, pag. 76–83, 2014.

MATSUSHITA, M.; KURAMITZ, H.; TANAKA, S. Electrochemical Oxidation for Low Concentration of Aniline in Neutral pH Medium: Application to the Removal of Aniline Based on the Electrochemical Polymerization on a Carbon Fiber. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 39, pag. 3805-3810, 2005.

MATTOSO, L. H. C.; MACDIARMID, A. G. In: SALAMONE, J.C., ed. *Polymeric materials encyclopedia*, Vol. 7, pag. 5505-5513, 1996.

MATTOSO, L. H. C.; Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades. *Química Nova*. Vol. 19, pag. 388, 1995.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol.10, pag. 248-28, 2006.

MIKHAIL A. VOROTYNTSEV, VERONIKA A. ZINOVYEVA, AND DMITRY V. KONEV; Mechanisms of Electro-polymerization and Redox Activity: Fundamental Aspects, in *Electropolymerization: Concepts, Materials and Applications*, S.a.K. Cosnier, S., 2010.

MILINSK, M. C.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V.; OLIVEIRA, C.C.; SOUZA, N.E. Comparative Analysis of Eight Esterification Methods in the Quantitative Determination of Vegetable Oil Fatty Acid Methyl Esters (FAME). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol.19, pag.475-1483, 2008.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Two diterpenoids from copaiba oil. *Phytochemistry*, Vol.42, pag.1653–1656, 1996.

MUNFORD M. L.: Eletrodeposição de filmes finos de cobalto em silício tipo-n monocristalino. 1998. 164 pag. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MURLI, C.; SONG, Y. Pressure-induced polymerization of acrylic acid: a Raman spectroscopic study. *J. Phy. Chem. B*. Vol. 30, pag. 9744–9750, 2010.

NARWAL, V.; PUNDIR, C.S. An improved amperometric triglyceride biosensor based on co-immobilization of nanoparticles of lipase, glycerol kinase and glycerol 3-phosphate
NILSSON, K.; LINDELL, J.; NORRLOW, O.; SELLERGREN, B.; J. Imprinted polymers as antibody mimetics and new affinity gels for selective separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. Vol. 680, pag 57-61, 1994.

NOVAK, I.; KOVAČ, B. Photoelectron spectroscopy of natural products: terpenes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. Vol 61, pag. 277-280, 2005.

NURUL HUWAIDA ROSLI, NOR MONICA AHMAD, MOHD AZRI AB RANI, CARLOS FERNANDEZ, ZAINIHARYATI MOHD ZAIN. The electroanalytical detection of triglyceride concentrations in olive oil using modified screen printed electrodes with ionic liquid [1-(2-ethoxyethyl)-1-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide]-lipase. *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*. Vol. 2, pag. 162-164, 2017.

PARDESHI, S.; DHODAPKAR, R.; KUMAR, A. Studies of the Molecular Recognition Abilities of Gallic Acid-imprinted Polymer Prepared Using a Molecular Imprinting Technique. *Adsorption Science & Technology*. Vol. 30, pag. 23-34, 2012.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. *A Zojono Journal of Nanotechnology Online*, Vol.3, 2007.

PAVIA, DONALD L.; LAMPMAN, GARY M.; KRIZ, GEORGE S.; VYVYAN, JAMES R. *Introdução à espectroscopia - Tradução da 5ª edição norte-americana*, 2010.

PIMENTEL, M. C. B.; LEÃO, A. B. F.; MELO, E. H. M.; Ledingham WM, Filho JL, Sivewright M, Kennedy JF. Immobilization of candida rugosa lipase on magnetized dacron: kinetic study. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 35:2, 221-235, 2009.

PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Production and partial characterization of lipase from penicillium verrucosum obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(2): 444-450, abr.-jun. 2008.

PINTO, A.C.; BRAGA, W. F.; REZENDE C.M.; GARRIDO, F.M.S.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O.A.C. Separation of acid

diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. *Journal of Brazilian Chemical Society*, Vol.11, pag. 355-360, 2000.

PYUN, J.; MATYJASZEWSKI, K. Synthesis of Nanocomposite Organic/Inorganic Hybrid Materials Using Controlled/"Living" Radical Polymerization *Chemistry of Materials*. Vol. 13, pag. 3436-3448, 2001.

Rejeb, I.; B.; Arduini, F.; Amine, A.; Gargouri, M.; Palleschi, G. Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 594, pag. 1–8, 2007.

RICHTER E.M., DE JESUS D.P., NEVES C.A., DO LAGO C.L., ANGNES L. Aplicações eletroanalíticas com eletrodos de prata confeccionados a partir de cds graváveis. *Química Nova*. Vol. 26, pag. 839-843, 2003.

RICHTER E.M., MAGAROTTO S., AUGELLI M.A., ANGNES L. Compact Disks, a New Source for Gold Electrodes. Application to the Quantification of Copper by PSA Electroanalysis. Vol. 13, pag. 760, 2001.

RICHTER, E.M. Desenvolvimento e Aplicações de Eletrodos de Ouro Confeccionados a Partir de Discos Compactos Graváveis (CD-Rs), Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2001.

RIGAMONTE-AZEVEDO, A.C.; WADT, P.G.S.; WADT, L. H.de O. *Copaíba: Ecologia e Produção de óleo-resina*. Rio Branco: Embrapa Acre, 28p. Documentos, pag. 91. 2004.

RODRÍGUEZ, J.; GRANDE, H. J.; OTERO, T. F. Polypyrrole: from basic research to technological applications. In: NALWA, H.S. (Ed). *Handbook of organic conductive molecules and polymers*. New York: John Wiley & Sons, 1977. Vol. 2, cap. 10, pag. 415-467.

ROHOM, A. B.; LONDHE, P. U.; MAHAPATRA, S. K.; KULKARNI, S. K.; CHAURE, N. B. Electropolymerization of polyaniline thin films. *High Performance Polymers*. Vol. 26, pag. 641–646, 2014.

ROMERO, A.L.; BAPTISTELLA, L.H.B.; IMAMURA, P.M. Absolute configuration of some dinorlabdanes from the copaiba oil. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, Vol.20, n.6, pag.1036–1040, 2009.

SALGADO, A. M. Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

SAMBASEVAM, K. P.; MOHAMAD, S.; PHANG, SOOK-WAI. Effect of dopant concentration on polyaniline for hydrazine detection. *Materials Science in Semiconductor Processing*. Vol. 33, pag. 24–31, 2015.

SANCHES, E. A.; SOARES, J. C.; MAFUD, A. C.; FERNANDES, E. G. R.; LEITE, SANT'ANNA, B.M.P.; FONTES, S.P.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. Characterization of woody odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *Journal Brazilian and Chemistry Society*, Vol.18, n.5, pag.984–989, 2007.

SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Synthesis, Characterization and Kinetics of Catalytically Active Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Recognition of 4-Aminophenol. *J. Braz. Chem. Soc.* Vol. 20, pag. 820-825, 2009.

SHIMA N.N.S. HASHIM, REINHARD I. BOYSEN, LACHLAN J. SCHWARZ, BASIL DANYLEC, MILTON T.W. HEARN. A comparison of covalent and non-covalent imprinting strategies for the synthesis of stigmasterol imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1359, pag. 35–43, 2014.

SHIRAKAWA, H; XXX. Synthesis of electrically conducting organic polymers – Halogen derivatives of polyacetylene. Journal of the chemical society-chemical communications. Vol. 16. PAG. 578-580, 1977.

SILVA, E. S.; MATHIAS, C. S.; LIMA, M. C. F.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; RODRIGUES, D. P.; CLEMENT, C. R. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. Pesq. agropec. Bras., Brasília. Vol.47, pag.1621-1628, nov. 2012.

SILVA, E. S.; MATHIAS, C. S.; LIMA, M. C. F.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; RODRIGUES, D. P.; CLEMENT, C. R. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. Pesq. agropec. Bras., Brasília, Vol.47, n.11, pag.1621-1628, nov. 2012.

SILVA, J. M. R.; NASCIMENTO, M. G. Epoxidação do β -cariofileno com lipases imobilizadas em gel de ágar. Química Nova, Vol. 37, No. 6, 1022-1027, 2014.

SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G, MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 1.ed., Porto Alegre, UFRS, 1999.

SKÖLD, M.; KARLBERG, A.; MATURA, M.; BÖRJE, A.; Food Chem. Toxicol. 2006, 44, 538.

SOARES, C. M.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. Appl. Biochem. Biotechnol. V.77, p. 745, 1999.

Solanki, S.; Pandey, C. M.; Soni, A.; Sumana, G.; Biradar, A. M. An amperometric bienzymatic biosensor for the triglyceride tributyrin using an indium tin oxide electrode coated with electrophoretically deposited chitosan-wrapped nanozirconia. Microchim Acta. Vol. 183, pag. 167–176, 2016.

STEJSKAL, J.; SAPURINA, I.; TRCHOVÁ, M. Polyaniline nanostructures and the role of aniline oligomers in their formation. *Progress in Polymer Science*. Vol. 35, pag. 1420–1481, 2010.

STROUNINA, E. V.; KANE-MAGUIRE, L. A.P.; WALLACE, G. G. Optically active sulfonated polyanilines. *Synthetic Metals*. Vol. 106, pag. 129–137, 1999.

SUN, J.; J. LU; X. ZHU; K. ZHANG, Z. LU. J. ZHU. Preparation and thermal decomposition of polyacrylamide and its derivatives by plasma-initiated polymerization. *Journal of thermal analysis and calorimetry*. VOL. 58, pag. 301-307, 1999.

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Química Nova*, Vol. 27, No. 2, 236-240, 2004.

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*, Vol. 28, No. 6, 1087-1101, 2005.

TINCUSI, B.M.; JIMÉNEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; MOUJIR, L.M.; MAMANI, Z.A.; BARROSO, J.P.; RAVELO, A.G.; HERNÁNDEZ, B.V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Planta Médica*, Vol.68, n.9, pag.808–812, 2002.

V. LAURINAVICIUS, B. KURTINAITIENE, V. GUREVICIENE, L. BOGUSLAVSKY, L. GENG AND T. SKOTHEIM. Amperometric glyceride biosensor. *Anal. Chim. Acta*, 1996, 330, 159.

VARELA, H.; HUGUENIN, F.; MALTA, M.; TORRESI, R. M. Materiais para cátodos de baterias secundárias de lítio. *Química Nova*, Vol. 25, No. 2, 287-299x, 2002.

VARELA, H.; TORRESI, R. M. Ionic Exchange phenomena related to the redox processo f polyaniline in nonaqueous media. *J. Electrochem. Soc.* Vol. 147, pag. 665-670, 2000.

VARELA, H.; TORRESI, R. M.; BUTTRY, D. A. Mixed Cation and Anion Transport during Redox Cycling of a Self-Doped Polyaniline Derivative in Nonaqueous Media. *J. Electrochem. Soc.* Vol. 147, pag. 4217-4223, 2000.

VASCONCELOS, A. F. F.; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. *Química Nova*, Vol. 25, No. 6, 2002.

VEIGA, V.F., JR.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Química Nova* Vol. 20, n.6, pag. 612 – 615, 1997.

VEIGA, V.F., JR.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. *Química Nova* 2002, 25, 273–286.

VIDAL, J. C.; GARCIA-RUIZ, E.; CASTILLO, J. R.; *Microchim. Acta* 2003, 143, 93.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HOSS, M. J.J. *Mol. Catal. B. Ezym.* 200, 9, 113. PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M. MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases *Enzyme microb. Technol.* V. 27, p. 187, 2000.

WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. *Nucleic Acids Research*, Vol.28, n.16, pag.3011-3016, 2000.

WARD, L.J.; SCHOFIELD, W.C.E.; BADIYAL, J.P.S. Atmospheric Pressure Plasma Deposition of Structurally Well-Defined Polyacrylic Acid Films. Vol 15, pag. 1466–1469, 2003.

Wei-Yin Liao, Chung-Chiun Liu, Tse-Chuan Chou. Detection of triglyceride using an iridium nano-particle catalyst based amperometric biosensor. *Analyst*, 2008, 133, 1757–1763.

WIDERA, J.; GROCHALA, W.; JACKOWSKA, K.; BUKOWSKA, J. Electrooxidation of o-methoxyaniline as studied by electrochemical and SERS methods. *Synthkic Xktals*. Vol. 89, pag. 29-37, 1997.

WU, N.; LUO, Z.; GE, Y.; GUO, P.; DU, K.; TANG, W.; DU, W.; ZENG, A.; CHANG, C.; FU, Q. A novel surface molecularly imprinted polymer as the solid-phase extraction adsorbent for the selective determination of ampicillin sodium in milk and blood samples. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Vol. 6, pag. 157–164, 2016.

WU, S.; TANA, W.; XUB, H. Protein molecularly imprinted polyacrylamide membrane: for hemoglobin sensing. *Analyst*. Vo. 135, pag. 2523–2527, 2010.

YAN, W.; FENG, X.; CHEN, X.; HOU, W.; ZHU, J. A super highly sensitive glucose biosensor based on Au nanoparticles–AgCl@polyaniline hybrid material. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol, 23, pag. 925–931, 2008.

YE L., MOSBACH K., *Molecular Imprinting: Synjthetic Materials As Substitutes Biological Antibodies and Receptors*, Chemical Materials, 2008, 20, 859-869.

Ye L., Mosbach K., *The Technique of Molecular Imprinting – Principle, State of the Art, And Future Aspects*, Chemistry and Materials Science, 2001,41, 107-113.

ZHENGHAO LIU; YUNKAI LV; JUNGANG GAO; XIAOLI LI; XUEFEI ZHAI; JIANHUA ZHAO; XIANGJIE XU. Molecularly Imprinted Poly(MAA-co-AM) Composite Membranes for Selective Recognition of Nicosulfuron Herbicide. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 126, pag. 1247–1256, 2012.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; TRIGO, J.R. Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) growing

wild in the States of Pará and Amapá, Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, Vol.21, n.6, 501-503, 2009.

ZOGHBI, M.G.B.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; TRIGO, J.R. Volatiles of oleoresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). *Journal of Essential Oil Research*, Vol.21, n.5, pag.403-404, 2009.

ZOOPPI RA, DE PAOLI MA. Aplicações tecnológicas de polímeros condutores: perspectivas atuais. *Química Nova*. Vol 16 (6), 560-569, 1993.

ZORNITTA, R. L.; PINCELLI, G.; RUOTOLO, L. A. M. Modificação do polímero condutor polianilina para uso como trocador catiônico. *Química Nova*, Vol. 37, No. 9, pag. 1459-1464, 2014.

ANEXOS

Atribuições das principais bandas de absorção dos espectros IV-TF dos polímeros e moléculas moldes.

Tabela 1: Atribuições das principais bandas de absorção no espectro IV-TF para os polímeros de poli(ácido acrílico) e β -cariofileno.

β -cariofileno	Número de onda observado (cm^{-1})		Atribuição
	Poliacrilamida		
	MIP antes da extração	MIP depois da extração e NIP	
886	-	-	C-H
1383; 1368	-	-	CH ₃
1451	-	-	CH ₂
-	1618	1618	NH
1633	-	-	C=C
-	1640	1640	OC-NH ₂
3000	3000	3000	CH ₂ e CH ₃
3071	-	-	C-H
-	3400 - 3500	3400 - 3500	RNH ₂

Tabela 2: Atribuições das principais bandas de absorção no espectro IV-TF para os polímeros de poli(ácido metacrílico) e β -cariofileno.

β -cariofileno	Número de onda observado (cm^{-1})		Atribuição
	Poli(ácido metacrílico)		
	MIP antes da extração	MIP depois da extração e NIP	
886	-	-	C-H
1383; 1368	-	-	CH ₃
1451	-	-	CH ₂
1633	1633	1633	C=C
-	1730	1730	C=O
-	2961; 2918	2961; 2918	CH ₂
3000	3000	3000	CH ₂ e CH ₃
3071	-	-	C-H
-	3200 - 3400	3200 - 3400	OH

Tabela 3: Atribuições das principais bandas de absorção no espectro IV-TF para os polímeros de poli(acrilamida) e β -cariofileno.

β -cariofileno	Número de onda observado (cm^{-1})		Atribuição
	Poli(ácido acrílico)		
	MIP antes da extração	MIP depois da extração e NIP	
886	-	-	C-H
1383; 1368	-	-	CH ₃
1451	-	-	CH ₂
1633	1633	1633	C=C

-	1724	1724	C=O
-	2961; 2918	2961; 2918	CH ₂
3000	3000	3000	CH ₂ e CH ₃
3071	-	-	C-H
-	3200 - 3400	3200 - 3400	OH

Tabela 4: Atribuições das principais bandas de absorção no espectro IV-TF para os polímeros de poli(ácido acrílico) e óxido de cariofileno.

Número de onda observado (cm⁻¹)			
Óxido de cariofileno	Poliacrilamida		Atribuição
	MIP antes da extração	MIP depois da extração e NIP	
775	-	-	epóxido
886	-	-	C-H
1383; 1368	-	-	CH ₃
1451	-	-	CH ₂
-	1618	1618	NH
1633	-	-	C=C
-	1640	1640	OC-NH ₂
2936; 2859	3000	3000	CH ₂ e CH ₃
3071	-	-	C-H
-	3400 - 3500	3400 - 3500	RNH ₂

Tabela 5: Atribuições das principais bandas de absorção no espectro IV-TF para os polímeros de poli(ácido metacrílico) e óxido de cariofileno.

Número de onda observado (cm⁻¹)			
Óxido de cariofileno	Poli(ácido metacrílico)		Atribuição
	MIP antes da extração	MIP depois da extração e NIP	
775	-	-	Epóxido
886	-	-	C-H
1383; 1368	-	-	CH ₃
1451	-	-	CH ₂
1633	1633	1633	C=C
-	1730	1730	C=O
2936; 2859	3000	3000	CH ₂ e CH ₃
-	2961; 2918	2961; 2918	CH ₂
3071	-	-	C-H
-	3200 - 3400	3200 - 3400	OH

Tabela 6: Atribuições das principais bandas de absorção no espectro IV-TF para os polímeros de poli(acrilamida) e óxido de cariofileno.

Número de onda observado (cm⁻¹)			
Óxido de cariofileno	Poli(ácido acrílico)		Atribuição
	MIP antes da extração	MIP depois da extração e NIP	
775	-	-	Epóxido
886	-	-	C-H

1383; 1368	-	-	CH ₃
1451	-	-	CH ₂
1633	1633	1633	C=C
-	1724	1724	C=O
-	2961; 2918	2961; 2918	CH ₂
2936; 2859	3000	3000	CH ₂ e CH ₃
3071	-	-	C-H
-	3200 - 3400	3200 - 3400	OH

Novel electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer for selective recognition of sesquiterpene β -caryophyllene

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 217 (2019) 271–277



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa



Novel electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer for selective recognition of sesquiterpene β -caryophyllene



Igor Medeiros de Assis^a, Maria Oneide Silva de Moraes^a, Relem Cativo da Conceição^a, Yonny Romaguera-Barcelay^b, Rodrigo Fernando Brambilla de Souza^d, Dunieskys Roberto González Larrudé^e, Maria Luiza Miranda Rocco^c, Walter Ricardo Brito^{a,*}

^a Department of Chemistry, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas 69067-005, Brazil

^b Department of Physics, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas 69067-005, Brazil

^c Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil

^d Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, 05508-000, Butantã, São Paulo, SP, Brazil

^e MackGraph, Universidade Presbiteriana Mackenzie, Rua da Consolação 896, Consolação, 01302-907 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2018

Received in revised form 26 March 2019

Accepted 28 March 2019

Available online 29 March 2019

Keywords:

β -Caryophyllene

MIP

Carbon paste electrode

ABSTRACT

Molecularly imprinted polymers provide an excellent platform for the modification of selective electrodes for sensing applications. Herein, we present a novel modified carbon paste electrode (CPE) with a selective molecularly imprinted polymer (MIP) for recognition of sesquiterpene β -caryophyllene, constituted of important plants oil-resins and extracts. The non-covalent MIP was synthesized using AA, EGDMA, and AIBN as a functional monomer, cross-linker and initiator agent, respectively. Structural and chemical characterization of the synthesized MIP was conducted through scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy, Raman spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). It was possible to verify the functional features of the synthesized MIP related to the extraction process of the template molecule. The CPE modified with MIP for sesquiterpene β -caryophyllene recognition was characterized by electrochemical techniques as cy-

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT



04/04/2019 870190032677
16:36
29409161903166518

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 006908 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 04378626000197

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. General Rodrigo Otávio, 3000 - Campus Universitário, Bairro

Japiim

Cidade: Manaus

Estado: AM