

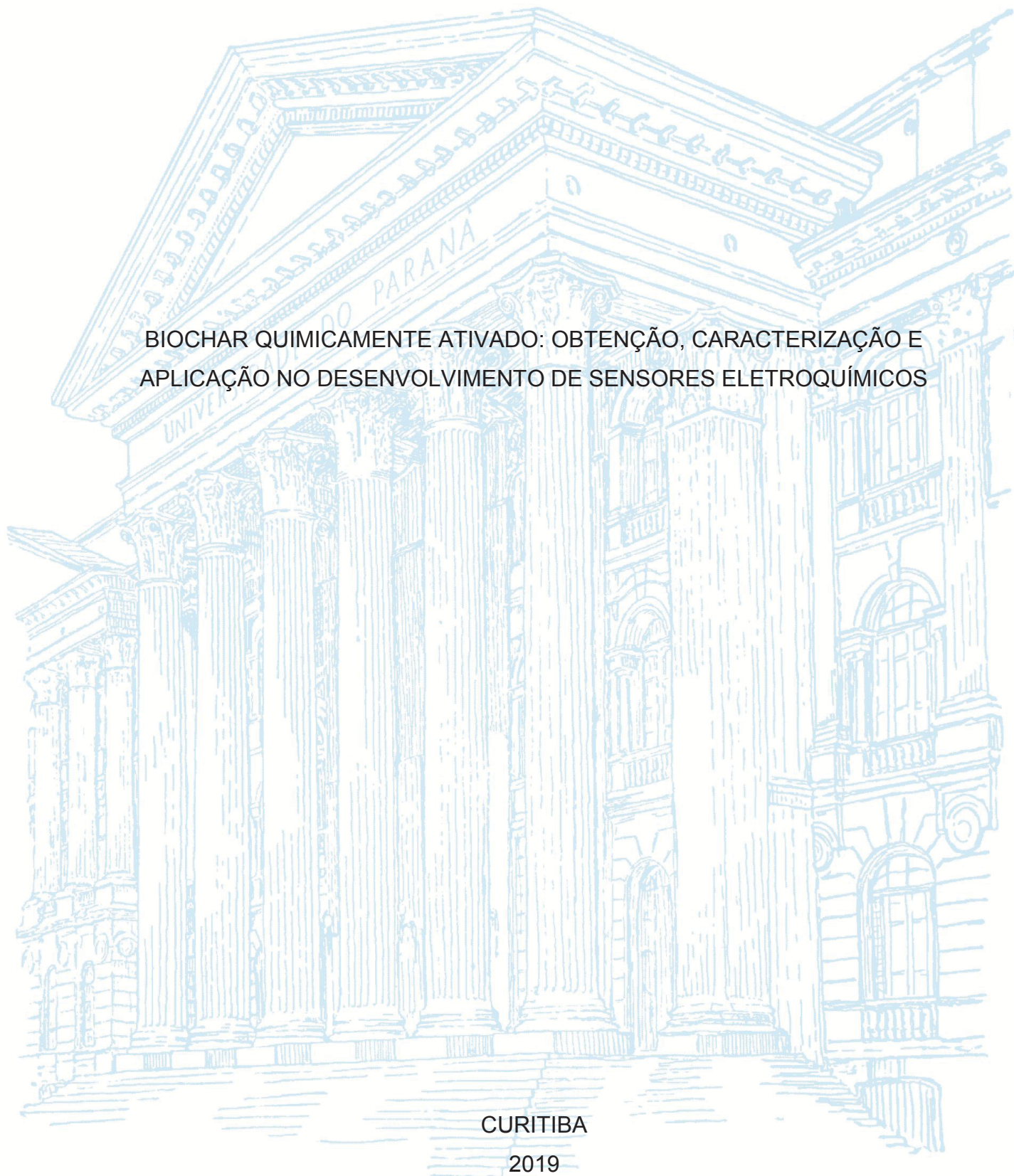
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTIANE KALINKE

BIOCHAR QUIMICAMENTE ATIVADO: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

CURITIBA

2019



CRISTIANE KALINKE

BIOCHAR QUIMICAMENTE ATIVADO: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Doutora em Química
Analítica, pelo Programa de Pós-Graduação
em Química, Setor de Ciências Exatas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando
Bergamini.

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Humberto
Marcolino Junior.

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

K14b Kalinke, Cristiane
Biochar quimicamente ativado: obtenção, caracterização e aplicação
no desenvolvimento de sensores eletroquímicos [recurso eletrônico] /
Cristiane Kalinke – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas,
Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Márcio Fernando Bergamini

Coorientador: Luiz Humberto Marcolino Junior

1. Biochar. 2. Sensores eletroquímicos. 3. Níquel. I. Universidade
Federal do Paraná. II. Bergamini, Márcio Fernando. III. Marcolino
Junior, Luiz Humberto. IV. Título.

CDD: 547.70457

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

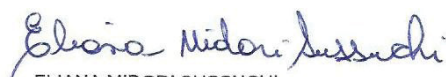
TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CRISTIANE KALINKE** intitulada: **Biochar quimicamente ativado: Obtenção, caracterização e aplicação no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

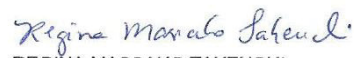
CURITIBA, 29 de Março de 2019.


MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI
Presidente da Banca Examinadora


ELIANA MIDORI SUSSUCHI
Avaliador Externo (UFS)


ANDREA PINTO DE OLIVEIRA
Avaliador Interno (UFPR)


NELSON RAMOS STRADIOTTO
Avaliador Externo (UNESP/ARAR)


REGINA MASSAKO TAKEUCHI
Avaliador Externo (UFU)

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professores Márcio Fernando Bergamini e Luiz Humberto Marcolino Jr., agradeço pela orientação durante o desenvolvimento desse trabalho. Pela atenção, dedicação, e ensinamentos.

Aos Professores Eliane Midori Sussuchi, Nelson Ramos Stradiotto, Regina Massako Takeuchi e Andrea Pinto de Oliveira, membros da banca de defesa.

Ao Professor Antonio Sálvio Mangrich e aos membros do LabPPAm pela matéria-prima e infraestrutura oferecidos para a obtenção das amostras de biochar.

Aos colegas do LabSense, agradeço por toda a ajuda, companheirismo, amizade e por proporcionarem um bom ambiente de trabalho. E a todos os alunos e colegas da Universidade Federal do Paraná que contribuíram diretamente, ou indiretamente na construção deste trabalho e também pela amizade.

Ao Professor Manel del Valle e aos membro do Grup de Sensors i Biosensors, da Universitat Autònoma de Barcelona, pela acolhida e troca de conhecimentos transmitida durante o período de estágio no exterior, pelo Programa de Doutorado Sandúiche no Exterior (PDSE – CAPES).

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos amigos de Pato Branco e da vida, agradeço pelo companheirismo, pela amizade, e por tantos momentos especiais.

Ao Paulo Roberto, meu melhor amigo e companheiro. Agradeço pelos momentos compartilhados, e também por participar diretamente no desenvolvimento deste trabalho, contribuindo com discussões e conselhos.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e souberam me aconselhar nos momentos de incerteza. E também a toda minha família, agradeço por todo apoio, compreensão, pelo carinho e amor.

RESUMO

O biochar é um material carbonáceo obtido pela pirólise de biomassa, e altamente funcionalizado, o que permite sua utilização na sorção ou imobilização de espécies. Com isso, o uso de eletrodos modificados com biochar se torna atrativo na pré-concentração espontânea e determinação voltamétrica de analitos. A quantidade de grupos funcionais do biochar pode ser aumentada por tratamentos químicos superficiais, o que melhora as suas propriedades sortivas. Neste trabalho, o biochar foi obtido a partir de resíduos de farelo de mamona, e foi submetido a diferentes condições de ativação química empregando HNO_3 e/ou H_2O_2 . As diferentes amostras foram caracterizadas e avaliadas na determinação de espécies inorgânicas e orgânicas. A amostra N2, tratada com HNO_3 50 % (v/v), a 60 °C por 3 horas, apresentou a melhor resposta, e foi utilizada na construção de EPCM para diferentes metodologias. Primeiramente, foi avaliada a capacidade do EPCM-N2 em pré-concentrar e determinar íons Ni(II), monitorando o par redox Ni(II)/Ni(III) em meio básico. A utilização do eletrodo proposto permitiu a determinação de íons Ni(II) em amostras fortificadas de bioetanol e água residuária. Em seguida, foi avaliada a capacidade de pré-concentração e determinação de ácido cafeico. O EPCM-N2 se mostrou eficiente na pré-concentração espontânea da espécie orgânica. O método foi aplicado para a determinação em amostras reais e fortificadas de diferentes tipos de vinho, e apresentou resultados satisfatórios e concordantes ao método espectroscópico, por Folin-Ciocalteu. Outra estratégia avaliada foi a capacidade do biochar em imobilizar NiOOH (EPCM-N2-Ni) na determinação não-enzimática de glicose, reação catalisada pela presença de NiOOH. O eletrodo foi empregado na determinação de glicose em amostras reais e fortificadas de fluídos biológicos em um sistema microfluídico baseado em fios têxteis (μTED), o que permitiu a diminuição de reagentes e resíduos, tornando este um método analítico verde, conforme comprovado por cálculos de Eco-Escala. O EPCM-N2 também foi avaliado para a incorporação simultânea de um mediador redox (azul da Prússia) e enzima glicose oxidase na determinação enzimática de glicose. O biossensor apresentou boa afinidade enzima-substrato e estabilidade após dias sucessivos de medida, e foi aplicado com eficiência na determinação de glicose em amostras de fluídos biológicos. Por fim, o EPCM-N2, em conjunto com outros eletrodos, foi aplicado em uma língua eletrônica voltamétrica, visando a distinção e determinação de catecol, 4-etilcatecol e 4-etilguaiaicol. A estratégia permitiu a discriminação e determinação das espécies, empregando ferramentas quimiométricas, PCA e redes neurais. Desta maneira, em virtude da capacidade de interação do biochar, melhorada pela sua ativação química, foi possível a aplicação em diferentes sensores eletroquímicos, com resultados satisfatórios em relação ao eletrodo sem modificação e modificado com biochar precursor (não tratado). Isso demonstra a versatilidade e a viabilidade do uso deste material como modificador para sensores, o que também é interessante do ponto de vista econômico e ecológico.

Palavras-chave: biochar ativado, sensores eletroquímicos, níquel, compostos fenólicos, glicose, dispositivo microfluídico, língua eletrônica.

ABSTRACT

Biochar is a carbonaceous material obtained by the biomass pyrolysis, and highly functionalized, which allows its use in the sorption or immobilization of species. The use of biochar modified electrodes becomes attractive in the spontaneous preconcentration and voltammetric determination of analytes. The amount of biochar functional groups can be increased by surface chemical treatments, improving the sorption properties. In this work, biochar was obtained from castor oil cake biomass, and subject to different chemical activation conditions using HNO_3 and/or H_2O_2 . The different samples were characterized and evaluated in the determination of inorganic and organic species. The sample N2, treated with 50 % (v/v) HNO_3 at 60 °C for 3 hours, presented the best response and was used in the construction of CPME for different methodologies. First, the ability of CPME-N2 to Ni(II) ions preconcentration and determination was monitored by Ni(II)/Ni(III) redox couple in basic media. The use of the proposed electrode allowed the determination of Ni(II) ions in spiked bioethanol and wastewater samples. After, the capacity of caffeic acid preconcentration and determination was evaluated. CPME-N2 was efficient in the spontaneous preconcentration of this organic specie. The method was applied for the determination in real and spiked wine samples, and presented satisfactory and concordant results compared to spectroscopic method, by Folin-Ciocalteu. Another strategy evaluated was the biochar ability for immobilize NiOOH (CPME-N2-Ni) for glucose non-enzymatic determination, a reaction catalyzed by the NiOOH presence. The electrode was used for glucose determination in real and spiked biological fluids samples, in a microfluidic system based on textile threads (μTED), which allowed the reduction of reagents and residues, making this a green analytical method as evidenced by the Eco-Scale score. CPME-N2 was also evaluated for the simultaneous incorporation of a redox mediator (Prussian blue) and glucose oxidase enzyme for the glucose enzymatic determination. The biosensor had good enzyme-substrate affinity and stability after successive measurement days, and was applied efficiently for the glucose determination in biological fluid samples. Finally, CPME-N2, with other electrodes, was applied in a voltammetric electronic tongue, aiming the distinction and determination of catechol, 4-ethylcatechol and 4-ethylguaiacol. The strategy allowed the discrimination and determination of these species, using chemometric tools, PCA and neural networks. In this way, due to the interaction capacity of the biochar, improved by the chemical activation, it was possible to apply different electrochemical sensors, with satisfactory results in relation to the electrode without modification and modified with precursor biochar (untreated). This demonstrates the versatility and feasibility of the biochar use as a sensor modifier, which is also interesting from the economic and ecological point of view.

Keywords: Activated biochar, electrochemical sensors, nickel, phenolic compounds, glucose, microfluidic device, electronic tongue.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – ESQUEMA DE OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOCHAR A PARTIR DE BIOMASSA | 21 |
| FIGURA 2 – ESQUEMA GENÉRICO DO MECANISMO EC' DE UM ELETRODO CONTENDO UM MEDIADOR REDOX PARA A OXIDAÇÃO OU REDUÇÃO DE UM ANALITO | 27 |
| FIGURA 3 – DIAGRAMA DE BODE PARA AS FORMAS ESTRUTURAIS DE Ni(OH) ₂ E NiOOH | 28 |
| FIGURA 4 – ESTRUTURA CÚBICA DO HEXACIANOFERRATO DE FERRO (AZUL DA PRÚSSIA) | 30 |
| FIGURA 5 – MODELO DE UMA IMPRESSORA TRIDIMENSIONAL (3D) POR MODELAGEM DE DEPOSIÇÃO FUNDIDA (FDM)..... | 35 |
| FIGURA 6 – ANALOGIA ENTRE O RECONHECIMENTO BIOLÓGICO GUSTATIVO E O EMPREGO DE UMA LÍNGUA ELETRÔNICA | 37 |
| FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DOS DADOS DE ENTRADA E DE SAÍDA PARA A APLICAÇÃO DE UMA REDE NEURAL ARTIFICIAL (ANN) EMPREGANDO DIFERENTES SENSORES..... | 38 |
| FIGURA 8 – ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO CAFEICO | 41 |
| FIGURA 9 – ESTRUTURA MOLECULAR DA GLICOSE | 42 |
| FIGURA 10 – ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS CATECOL (A), 4-ETILCATECOL (B) E 4-ETILGUAIACOL (C)..... | 44 |
| FIGURA 11 – COMPONENTES UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DOS EPC, CONTENDO SUPORTE DE PVC (a) COM HASTE DE COBRE PARA CONTATO ELÉTRICO (b), E A PASTA DE CARBONO (c) INCORPORADA A EXTREMIDADE DO ELETRODO. CONFIGURAÇÃO FINAL DO EPC, PRONTO PARA USO (d) | 54 |
| FIGURA 12 – PROCEDIMENTO DE CONSTRUÇÃO DO SISTEMA MICROFLUÍDICO (μTED), COM OS COMPONENTES E AS ETAPAS DO PROCESSO DE MONTAGEM..... | 55 |
| FIGURA 13 – COMPOSIÇÃO DO DISPOSITIVO μTED (A): RESERVATÓRIOS DE ENTRADA (a) E SAÍDA (b), ZONA DE INJEÇÃO (c), ELETRODOS DE GRAFITE (d), ELETRODO DE TRABALHO (e) COM O CONTATO ELÉTRICO (f), E CAMINHO ANALÍTICO DE FIOS TÊXTEIS (g). DETALHE DO ALINHAMENTO | |

| | |
|---|----|
| DOS FIOS, E IMAGEM DE MEV DE UM FIO DE ALGODÃO, COM AUMENTO DE 200 VEZES (B)..... | 56 |
| FIGURA 14 – PROCEDIMENTO DE CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS, COMPOSTOS POR UMA HASTE DE COBRE ACOPLADA A UM CONECTOR (a); FIXAÇÃO DO DISCO DE COBRE ($\varnothing = 5,0$ mm) (b); MONTAGEM DO SUPORTE DE PVC NO CONECTOR (c), COMPACTAÇÃO DA PASTA DE CARBONO (d) E ELETRODO PRONTO PARA USO (e)..... | 57 |
| FIGURA 15 – PROCEDIMENTOS VOLTAMÉTRICOS ADOTADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS, PARA COMPOSTOS INORGÂNICOS (A) E ORGÂNICOS (B) | 59 |
| FIGURA 16 – PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL..... | 60 |
| FIGURA 17 – PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO ÁCIDO CAFEICO | 63 |
| FIGURA 18 – PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE..... | 67 |
| FIGURA 19 – PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE..... | 70 |
| FIGURA 20 – PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS CATECOL, 4-ETILCATECOL E 4-ETILGUAIACOL | 75 |
| FIGURA 21 – IMAGENS DE MEV OBTIDAS PARA A AMOSTRA DE BIOCHAR PRECURSOR COM AUMENTO DE 300 (A) E 2.000 VEZES (B), E PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR ATIVADO N1 (C) E N2 (D), COM AUMENTO DE 2.000 VEZES..... | 81 |
| FIGURA 22 – IMAGENS DE MEV OBTIDAS PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR ATIVADO: N3 (A); N4 (B); N5 (C); NH (D); H1 (E) E H2 (F), COM AUMENTO DE 2.000 VEZES..... | 82 |
| FIGURA 23 – ESPECTROGRAMAS DE EDS OBTIDOS PARA A AMOSTRA DE BIOCHAR PRECURSORA, COM AUMENTO DA REGIÃO ENTRE 0,4 E 4,0 keV (A), E PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR ATIVADO (B)..... | 84 |
| FIGURA 24 – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS E PROCESSOS DE PERDA DE MASSA OBTIDOS POR TGA PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR..... | 86 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 25 – ESPECTROS RAMAN E RAZÕES ENTRE AS BANDAS D E G (I_D/I_G) OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR PRECURSOR E ATIVADAS..... | 90 |
| FIGURA 26 – ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR PRECURSOR E ATIVADAS | 91 |
| FIGURA 27 – POTENCIAL DE ZETA OBTIDO EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO PH PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR PRECURSOR E ATIVADAS..... | 96 |
| FIGURA 28 – VOLTAMOGRAMAS DE DPV OBTIDOS COM OS ELETRODOS EPC, EPCM-BC E EPCM-N2 ANTES (LINHA TRACEJADA) E APÓS A PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Pb(II) 0,10 mmol L ⁻¹ (LINHA SÓLIDA) (A). INTENSIDADES DE CORRENTE DE PICO OBTIDAS EM FUNÇÃO DE TODOS OS ELETRODOS AVALIADOS (B) | 98 |
| FIGURA 29 – INTENSIDADES DE CORRENTE DE PICO OBTIDAS NA PRESENÇA DE ÍONS Cd(II), Cu(II) E DOS PESTICIDAS PARAQUAT (PQ) E METIL PARATION (MP)..... | 100 |
| FIGURA 30 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O EPC (—), EPCM-BC (—) E EPCM-N2 (—) APÓS PRÉ-CONCENTRAÇÃO NA PRESENÇA DE ÍONS Ni(II) 5,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ . NO DETALHE: VOLTAMOGRAMAS NA AUSÊNCIA DO EPCM-N2, PARA EFEITO COMPARATIVO. v: 50 mV s ⁻¹ | 105 |
| FIGURA 31 – IMAGEM DE MEV, COM AUMENTO DE 1500 VEZES, (A) E MAPEAMENTO QUÍMICO OBTIDO POR EDS PARA A SUPERFÍCIE DO EPCM-N2 CORRESPONDENTE AOS ELEMENTOS: CARBONO (B), OXIGÊNIO (C), NITROGÊNIO (D), ENXOFRE (E) E NÍQUEL (F) | 107 |
| FIGURA 32 – CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA OBTIDA PARA ÍONS Ni(II) COM A VARIAÇÃO DO TEMPO (A) E DO POTENCIAL APLICADO (B) DURANTE A ETAPA DE CONDICIONAMENTO | 110 |
| FIGURA 33 – CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA (N=3) E A VARIAÇÃO DO pH DA SOLUÇÃO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (ACETATO DE SÓDIO 0,10 mol L ⁻¹) (A). DIAGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES OBTIDO PARA O NÍQUEL NA PRESENÇA DE TAMPÃO ACETATO (B)..... | 111 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 34 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS (A) E CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA (N=3) E A VARIAÇÃO DO TEMPO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (B). v: 50 mV s ⁻¹ | 112 |
| FIGURA 35 – CURVA ANALÍTICA (INSERIDA) E VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS Ni(II): 1,0 A 30 μmol L ⁻¹ . v: 50 mV s ⁻¹ | 114 |
| FIGURA 36 – VALORES DE CORRENTE RELATIVA OBTIDOS PARA MEDIDAS CONSECUTIVAS DE NÍQUEL PARA AVALIAR A REPETIBILIDADE (A) E A REPRODUTIBILIDADE (B) | 116 |
| FIGURA 37 – CORRENTES DE PICO RELATIVAS OBTIDAS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES CONCOMITANTES EM CONCENTRAÇÕES DE 1,0 E 10 μmol L ⁻¹ PARA A DETERMINAÇÃO DE ÍONS Ni(II) | 117 |
| FIGURA 38 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E CURVA DE ADIÇÃO DE PADRÃO (INSERIDA) OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL NA AMOSTRA DE BIOETANOL | 118 |
| FIGURA 39 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS COM OS ELETRODOS EPC (—), EPCM-BC (—) E EPCM-N2 (—) APÓS PRÉ-CONCENTRAÇÃO NA PRESENÇA DE 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ DE ÁCIDO CAFEICO. v: 50 mV s ⁻¹ | 121 |
| FIGURA 40 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS (A) E CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA (N=3) PARA O ÁCIDO CAFEICO E A VARIAÇÃO DO TEMPO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (B)..... | 123 |
| FIGURA 41 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS (A) E INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA (N=3) PARA O ÁCIDO CAFEICO COM A VARIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE BIOCHAR NA PASTA DE CARBONO (B) | 124 |
| FIGURA 42 – CORRELAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICO OBTIDAS PARA O ÁCIDO CAFEICO EM FUNÇÃO DOS DIFERENTES VALORES DE PH DA SOLUÇÃO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (A). GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DO ÁCIDO CAFEICO (B)..... | 125 |
| FIGURA 43 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E CURVA ANALÍTICA OBTIDOS DE 1,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ A 3,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ DE ÁCIDO CAFEICO (A). AMPLIAÇÃO DE 1,0 μmol L ⁻¹ A 0,30 mmol L ⁻¹ (B). v = 75 mV s ⁻¹ | 127 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 44 – VALORES DE CORRENTE RELATIVA OBTIDOS PARA MEDIDAS CONSECUTIVAS DE ÁCIDO CAFEICO PARA AVALIAR A REPETIBILIDADE (A) E A REPRODUTIBILIDADE (B) | 129 |
| FIGURA 45 – CORRENTES DE PICO RELATIVAS OBTIDAS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES CONCOMITANTES PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO | 129 |
| FIGURA 46 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS COM OS ELETRODOS DE REFERÊNCIA DE Ag/AgCl KCl 3,0 mol L ⁻¹ (—) E GRAFITE CILÍNDRICO (—). v: 50 mV s ⁻¹ | 134 |
| FIGURA 47 – VOLTAMOGRAMAS OBTIDOS COM O EPCM-N2Ni NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE 0,10 mmol L ⁻¹ DE GLICOSE (A). ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS REAÇÕES QUE OCORREM APÓS A ADIÇÃO DE GLICOSE (B)..... | 135 |
| FIGURA 48 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O PAR Ni(II)/Ni(III) (A) E CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS POR AMPEROMETRIA (N=3) (B) EMPREGANDO OS ELETRODOS EPC, EPCM-BCNi E EPCM-N2Ni. ADIÇÕES DE GLICOSE: 50 A 800 μmol L ⁻¹ . POTENCIAL APLICADO: 0,60 V. | 137 |
| FIGURA 49 – AVALIAÇÃO DA VAZÃO DO SISTEMA μTED CONTENDO O EPCM-N2Ni, REALIZADA DE 0 A 30 MINUTOS | 138 |
| FIGURA 50 – CORRELAÇÃO ENTRE A SENSIBILIDADE (N=3) OBTIDA NA PRESENÇA DE GLICOSE COM A VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CICLOS PARA A FORMAÇÃO DE NiOOH (A) E DA CONCENTRAÇÃO DE KOH (ELETRÓLITO SUPORTE) (B)..... | 139 |
| FIGURA 51 – CORRELAÇÃO ENTRE A SENSIBILIDADE (N=3) OBTIDA NA PRESENÇA DE GLICOSE COM A VARIAÇÃO DO POTENCIAL APLICADO NAS MEDIDAS AMPEROMÉTRICAS (B) | 140 |
| FIGURA 52 – CORRELAÇÃO ENTRE A SENSIBILIDADE (N=3) OBTIDA NA PRESENÇA DE GLICOSE COM A VARIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE BIOCHAR NA PASTA DE CARBONO (A). CORRELAÇÃO ENTRE O VOLUME DE INJEÇÃO DE GLICOSE (■) E A FREQUÊNCIA ANALÍTICA (●) (B). INJEÇÃO DE GLICOSE: 0,5 A 5,0 mmol L ⁻¹ | 141 |
| FIGURA 53 – AMPEROGRAMAS OBTIDOS PARA INJEÇÕES DE GLICOSE (N=3) NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO 5,0 x 10 ⁻⁶ A 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ . INSERIDO: CURVA ANALÍTICA OBTIDA A PARTIR DE ADIÇÕES DE GLICOSE EM | |

| | |
|---|-----|
| CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (A), E AUMENTO DOS SINAIS TRANSIENTES (B). ELETRÓLITO SUPORTE: KOH 30 mmol L ⁻¹ . VOLUME DE INJEÇÃO: 2,0 µL..... | 144 |
| FIGURA 54 – VALORES DE CORRENTE RELATIVA OBTIDOS PARA MEDIDAS CONSECUTIVAS DE GLICOSE PARA AVALIAR A REPETIBILIDADE (A) E A REPRODUTIBILIDADE DO SISTEMA (B). ELETRÓLITO SUPORTE: KOH 30 mmol L ⁻¹ . VOLUME DE INJEÇÃO: 2,0 µL..... | 146 |
| FIGURA 55 – CORRENTES DE PICO RELATIVAS OBTIDAS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES CONCOMITANTES PARA A DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE | 146 |
| FIGURA 56 – IMAGEM DE MEV, COM AUMENTO DE 1500 VEZES (A) E MAPEAMENTO QUÍMICO OBTIDO POR EDS PARA A SUPERFÍCIE DO EPCM- N2 CORRESPONDENTE AOS ELEMENTOS: CARBONO (B), OXIGÊNIO (C), NITROGÊNIO (D), SILÍCIO (E) E FERRO (F)..... | 152 |
| FIGURA 57 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA A FORMAÇÃO DO AZUL DA PRÚSSIA (PB). ELETRÓLITO SUPORTE: K ₃ [Fe(CN) ₆] EM PBS 0,10 mol L ⁻¹ pH 3,0. NÚMERO DE CICLOS: 30. v: 50 mV s ⁻¹ | 153 |
| FIGURA 58 – IMAGEM DE MEV (A) COM AUMENTO DE 1000 VEZES E ESPECTRO DE EDS (B) OBTIDOS PARA A SUPERFÍCIE DO EPCM-N2 APÓS A FORMAÇÃO DE AZUL DA PRÚSSIA | 154 |
| FIGURA 59 – IMAGENS DE MEV COM AMPLIAÇÃO DE 10 k VEZES, UTILIZANDO DETECÇÃO DE ELÉTRONS RETROESPALHADOS (C) E SECUNDÁRIOS (D) | 155 |
| FIGURA 60 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS APÓS A FORMAÇÃO DO PB EM PBS 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,0. v: 50 mV s ⁻¹ (A). ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS REAÇÕES QUE OCORREM APÓS A ADIÇÃO DE GLICOSE (B)..... | 155 |
| FIGURA 61 – AMPEROGRAMAS (A) E INFLUÊNCIA DA SENSIBILIDADE EM FUNÇÃO DO TIPO DE ELETRODO (B). ELETRÓLITO SUPORTE: PBS 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,0. POTENCIAL APLICADO: -0,10 V..... | 157 |
| FIGURA 62 – ESQUEMA DE INCORPORAÇÃO DA ENZIMA GOx NA SUPERFÍCIE DO BIOCHAR ATIVADO, UTILIZANDO O PAR EDC/NHS | 158 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 63 – FORMAÇÃO DE AZUL DA PRUSSIA NA SUPERFÍCIE DO EPCM-N2 EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CICLOS (NO DETALHE). ELETRÓLITO SUPORTE: PBS pH 3,0. v: 50 mV s ⁻¹ . | 159 |
| FIGURA 64 – INFLUÊNCIA DAS SENSIBILIDADES OBTIDAS EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO POTENCIAL APLICADO DURANTE AS MEDIDAS AMPEROMÉTRICAS PARA A GLICOSE. ADIÇÕES DE GLICOSE: 1,0 A 4,0 mmol L ⁻¹ . | 159 |
| FIGURA 65 – INFLUÊNCIA DAS SENSIBILIDADES OBTIDAS EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZINA IMOBILIZADA NO ELETRODO. ADIÇÕES DE GLICOSE: 1,0 A 4,0 mmol L ⁻¹ . POTENCIAL APLICADO: 0,00 V..... | 160 |
| FIGURA 66 – INFLUÊNCIA DAS SENSIBILIDADES OBTIDAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA NO ELETRODO. ADIÇÕES DE GLICOSE: 1,0 A 4,0 mmol L ⁻¹ . POTENCIAL APLICADO: 0,00 V..... | 161 |
| FIGURA 67 – INFLUÊNCIA DAS SENSIBILIDADES OBTIDAS EM FUNÇÃO DO PH DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Fe(III) NO BIOCHAR. ADIÇÕES DE GLICOSE: 1,0 A 4,0 mmol L ⁻¹ . POTENCIAL APLICADO: 0,00 V..... | 162 |
| FIGURA 68 – AMPEROGRAMAS E CURVA ANALÍTICA (INSERIDA) OBTIDOS PARA ADIÇÕES DE GLICOSE NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO 5,0 x 10 ⁻⁵ A 5,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ (N=3) . | 163 |
| FIGURA 69 – VALORES DE SENSIBILIDADE RELATIVA OBTIDOS PARA MEDIDAS CONSECUTIVAS DE GLICOSE PARA AVALIAR A REPETIBILIDADE (A) E A REPRODUTIBILIDADE (B)..... | 166 |
| FIGURA 70 – VALORES DE CORRENTE RELATIVA OBTIDOS PARA MEDIDAS AMPEROMÉTRICAS NA PRESENÇA DE 1,0 mmol L ⁻¹ DE GLICOSE PARA AVALIAR A ESTABILIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO..... | 167 |
| FIGURA 71 – AMPEROGRAMAS (A) CORRENTES DE PICO RELATIVAS (B) OBTIDOS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES CONCOMITANTES PARA A DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE . | 168 |
| FIGURA 72 – IMAGENS DE MEV OBTIDAS PARA O GRAFITE (A), NANOTUBOS DE CARBONO (B) E BIOCHAR ATIVADO (C) COM AUMENTO DE 50.000 VEZES E PARA SUPERFÍCIES DOS ELETRODOS EPC (D), EPCM-NTC (E) E EPCM-N2 (F) COM AUMENTO DE 1.000 VEZES . | 173 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 73 – ESPECTROS DE EDS OBTIDOS PARA EPC, EPCM-NTC E EPCM-N2, NA REGIÃO DE 0,0 A 4,0 KEV, E COMPOSIÇÃO ELEMENTAR OBTIDA A PARTIR DOS ESPECTROS..... | 174 |
| FIGURA 74 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS (A) E DIAGRAMAS DE NYQUIST (B) OBTIDOS PARA OS ELETRODOS EPC, EPCM-NTC E EPCM-N2 NA PRESENÇA DE 5,0 mmol L ⁻¹ DE K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆]. v: 10 mV s ⁻¹ | 175 |
| FIGURA 75 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS COM OS ELETRODOS EPC (A), EPCM-N2 (B) E EPCM-NTC (C) PARA OS COMPOSTOS CAT (—), 4-EC (—) E 4-EG (—). ELETRÓLITO SUPORTE: PBS 5,0 mmol L ⁻¹ pH 7,4. v: 50 mV s ⁻¹ | 178 |
| FIGURA 76 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O EPC (A), EPCM-NTC (B) E EPCM-N2 (C) NA AUSÊNCIA (BRANCO) (—) E NA PRESENÇA DE 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (—), E APÓS A ETAPA DE LIMPEZA ELETROQUÍMICA (—). | 180 |
| FIGURA 77 – VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS RELATIVAS OBTIDAS A PARTIR DE MEDIDAS CONSECUTIVAS (N=25) EMPREGANDO EPC (A), EPCM-NTC (B) E EPCM-N2 (C) NA PRESENÇA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS..... | 181 |
| FIGURA 78 – CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS POR VOLTAMETRIA CÍCLICA COM OS ELETRODOS EPC (A), EPCM-NTC (B) E EPCM-N2 (C) PARA OS COMPOSTOS FENÓLICOS CAT (■), 4-EC (●) E 4-EG (◆). ELETRÓLITO SUPORTE: PBS 5,0 mmol L ⁻¹ pH 7,4. v: 50 mV s ⁻¹ | 182 |
| FIGURA 79 – GRÁFICOS DE SCORES (A) E LOADINGS (B) OBTIDOS A PARTIR DE ANÁLISE DE PCA DAS DUAS PRIMEIRAS COMPONENTES (PC1 E PC2), PARA OS COMPOSTOS CATECOL, 4-ETILCATECOL E 4-ETILGUAIACOL, EMPREGANDO OS ELETRODOS EPC, EPCM-NTC E EPCM-N2 (N=3)..... | 184 |
| FIGURA 80 – MODELAGENS OBTIDAS POR ANN PARA AS CONCENTRAÇÕES ESPERADAS E OBTIDAS COM O CONJUNTO DE TREINAMENTO (◆) E DE TESTE (---) PARA O CATECHOL (A), 4-ETILCATECOL (B) E 4-ETILGUAIACOL (C). LINHA TEÓRICA (---)..... | 185 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| TABELA 1 – REAGENTES UTILIZADOS PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES | 49 |
| TABELA 2 – CONDIÇÕES DE TRATAMENTO UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR ATIVADO | 51 |
| TABELA 3 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL | 61 |
| TABELA 4 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO | 64 |
| TABELA 5 – CONCENTRAÇÕES (MÍNIMA, MÉDIA E MÁXIMA) DE ÁCIDO CAFEICO E OUTRAS ESPÉCIES COMUMENTE ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE VINHO | 65 |
| TABELA 6 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE | 68 |
| TABELA 7 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE | 72 |
| TABELA 8 – PLANEJAMENTO FATORIAL 3 ³ APLICADO PARA AS MEDIDAS DO SUBCONJUNTO DE TREINAMENTO E CONCENTRAÇÕES DO SUBCONJUNTO DE TESTE..... | 77 |
| TABELA 9 – COMPOSIÇÃO ELEMENTAR SEMI-QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR OBTIDA POR ANÁLISES DE EDS | 85 |
| TABELA 10 – VALORES DE pH E CONDUTIVIDADE ELÉTRICA OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR PRECURSOR E ATIVADAS (N=3)..... | 88 |
| TABELA 11 – GRUPAMENTOS ÁCIDOS TOTAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE BIOCHAR..... | 93 |
| TABELA 12 – INTERVALOS DE POTENCIAL ZETA (ZP) E PONTO ISOELÉTRICO (IEP) OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR (N=1) | 97 |
| TABELA 13 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR OBTIDAS PELO MÉTODO DE B.E.T. | 108 |
| TABELA 14 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÍONS Ni(II) | 113 |
| TABELA 15 – COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO ELETROQUÍMICO APLICADO PARA A DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL | 115 |

| | |
|--|-----|
| TABELA 16 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO | 126 |
| TABELA 17 – DESEMPENHO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ÁCIDO CAFEICO EM AMOSTRAS DE VINHO..... | 128 |
| TABELA 18 – CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO CAFEICO ENCONTRADO EM AMOSTRAS DE DIFERENTES VINHOS, PELOS MÉTODOS DE FOLIN-CIOCALTEU E VOLTAMÉTRICO, E VALORES DE RECUPERAÇÃO PARA AMOSTRAS FORTIFICADAS (N = 3)..... | 131 |
| TABELA 19 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE | 143 |
| TABELA 20 – DESEMPENHO ANALÍTICO DE SENSORES NÃO-ENZIMÁTICOS A BASE DE NÍQUEL PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICOSE | 145 |
| TABELA 21 – CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE ENCONTRADA E RECUPERADA, PELO MÉTODO NÃO-ENZIMÁTICO, PARA AS AMOSTRAS DE SALIVA E SORO SANGUÍNEO (N = 3) | 147 |
| TABELA 22 – PONTOS DE PENALIDADE (PPS) OBTIDOS PARA O MÉTODO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE..... | 148 |
| TABELA 23 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE | 163 |
| TABELA 24 – DESEMPENHO ANALÍTICO DE SENSORES ENZIMÁTICOS A BASE DE AZUL DA PRÚSSIA E GO _x PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICOSE | 165 |
| TABELA 25 – CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE ENCONTRADA E RECUPERADA PELO MÉTODO ENZIMÁTICO, PARA AS AMOSTRAS DE SALIVA E SORO SANGUÍNEO (N = 3) | 169 |
| TABELA 26 – PARÂMETROS ELÉTRICOS OBTIDO POR MEDIDAS DE EIS PARA EPC, EPCM-NTC E EPCM-N2, NA PRESENÇA DE 5,0 mmol L ⁻¹ DE K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (N=3)..... | 176 |
| TABELA 27 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS PARA A APLICAÇÃO DA ET NA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.... | 177 |
| TABELA 28 – PARÂMETROS ANALÍTICOS OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CAT, 4-EC E 4-EG UTILIZANDO OS ELETRODOS EPC, EPCM-NTC E EPCM-N2 | 183 |

| | |
|--|-----|
| TABELA 29 – RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA APLICAÇÃO DA LÍNGUA ELETRÔNICA COM O MODELO DE ANN PARA OS SUBCONJUNTOS DE TREINAMENTO E DE TESTE EM RELAÇÃO AOS COMPOSTOS FENÓLICOS AVALIADOS..... | 186 |
| TABELA 30 – DISCIPLINAS CURSADAS DURANTE O DOUTORADO, COM OS RESPECTIVOS CRÉDITOS E CONCEITOS OBTIDOS..... | 212 |

LISTA DE SIGLAS

AA – ácido ascórbico

ABS – Acrilonitrilo-Butadieno-Estireno

AC – ácido clorogênico

AG – ácido gálico

ANN – (do inglês, *artificial neural networks*) redes neurais artificiais

BC – biochar

B.E.T. – método de Brunauer, Emmett e Teller

BG – verde de Berlin

CAT – catecol

CATQ – catequina

DPV – (do inglês, *differential pulse voltammetry*) voltametria de pulso diferencial

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDS – (do inglês, *energy dispersive spectroscopy*) espectroscopia de energia dispersiva

EIS – (do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*) espectroscopia de impedância eletroquímica

EPC – eletrodo de pasta de carbono

EPCM – eletrodo de pasta de carbono modificado

EQM – eletrodos quimicamente modificados

ET – (do inglês, *electronic tongues*) línguas eletrônicas

FeHCF – hexacianoferrato de ferro

FDM – técnica por modelagem de deposição fundida

FIA – (do inglês, *Flow Injection Analysis*) análises por injeção em fluxo

FTIR – (do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*) espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

GLU – glicose

GOx – enzima glicose oxidase

IEP – (do inglês, *isoelectric point*) ponto isoelétrico

K_M^{app} – constante cinética aparente de Michaelis-Menten

LA – (do inglês, *lactic acid*) ácido láctico

LOD – limite de detecção

LOQ – limite de quantificação

LDR – (do inglês, *linear dynamic range*) região linear dinâmica

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MP – Metil paration

NHS – N-hidróxisuccinimida

NTC – nanotubos de carbono

PB – azul da Prússia

PBS – (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) tampão fosfato salino

PW – branco da Prússia

PCA – (do inglês, *Principal Component Analysis*) análise de componentes principais

PPs – pontos de penalidade

PQ – paraquat

QUER – quercetina

RESV – resveratrol

RSD – (do inglês, *relative standard deviation*) desvio padrão relativo

SD – (*standard deviation*) desvio padrão

SWV – (do inglês, *square-wave voltammetry*) voltametria de onda quadrada

TGA – (do inglês, *thermogravimetric analysis*) análise termogravimétrica

UR – ureia

TPI – Terra Preta de Índios

ZP – (do inglês, *zeta potential*) potencial zeta

4-EC – 4-etilcatecol

4-EG – 4-etilguaiacol

μTED – (do inglês, *microfluidic thread-based electroanalytical device*) sistema microfluídico baseado em fios têxteis

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 BIOCHAR | 21 |
| 1.2 BIOCHAR NA CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS | 25 |
| 1.2.1 Modificação de Eletrodos | 25 |
| 1.3 OUTRAS APLICAÇÕES DE SENSORES ELETROQUÍMICOS | 32 |
| 1.3.1 Dispositivos Microfluídicos | 33 |
| 1.3.2 Línguas Eletrônicas Voltamétricas | 36 |
| 1.4 ANALITOS AVALIADOS | 39 |
| 1.4.1 Níquel | 39 |
| 1.4.2 Ácido Cafeico | 41 |
| 1.4.3 Glicose | 42 |
| 1.4.4 Catecol, 4-etilcatecol e 4-etilguaiacol | 43 |
| 2. OBJETIVOS | 46 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 47 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 47 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 48 |
| 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES | 49 |
| 3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR ATIVADO | 50 |
| 3.2.1 Construção de Eletrodos | 53 |
| 3.2.2 Caracterização Voltamétrica dos EPCM Com Biochar Ativado | 58 |
| 3.3 DETERMINAÇÃO DE ÍONS NÍQUEL (II) | 60 |
| 3.3.1 Otimização dos Parâmetros Instrumentais para a Determinação de Níquel | 61 |
| 3.3.2 Desempenho Analítico do EPCM-N2 | 61 |
| 3.3.3 Influência de Espécies Concomitantes na Determinação de Níquel | 62 |
| 3.3.4 Determinação de Ni(II) em Amostras Fortificadas | 62 |
| 3.4 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO | 62 |
| 3.4.1 Otimização dos Parâmetros Instrumentais para a Determinação de Ácido Cafeico | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.2 Desempenho Analítico do EPCM-N2..... | 64 |
| 3.4.3 Influência de Espécies Concomitantes na Determinação de Ácido Cafeico..... | 65 |
| 3.4.4 Determinação de Ácido Cafeico em Amostras de Vinho | 65 |
| 3.5 DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE..... | 66 |
| 3.5.1 Otimização dos Parâmetros Instrumentais para a Determinação Não-enzimática de Glicose..... | 67 |
| 3.5.2 Desempenho Analítico do EPCM-N2Ni acoplado ao μ TED..... | 69 |
| 3.5.3 Influência de Espécies Concomitantes na Determinação de Glicose ... | 69 |
| 3.5.4 Determinação Não-enzimática de Glicose em Amostras de Soro e Saliva | 69 |
| 3.6 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE..... | 70 |
| 3.6.1 Otimização dos Parâmetros Experimentais para a Determinação Enzimática de Glicose | 72 |
| 3.6.2 Desempenho Analítico do Biossensor EPCM-N2-PB-GOx..... | 72 |
| 3.6.3 Influência de Espécies Concomitantes na Determinação Enzimática de Glicose..... | 73 |
| 3.6.4 Determinação Enzimática de Glicose em Amostras de Saliva e Soro Sanguíneo | 73 |
| 3.7.1 Caracterização dos Sensores..... | 74 |
| 3.7.2 Desempenho Analítico dos Sensores | 76 |
| 3.7.3 Aplicação da Língua Eletrônica | 76 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 79 |
| 4.1 OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOCHAR ATIVADO EM ELETRODOS..... | 80 |
| 4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 81 |
| 4.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)..... | 83 |
| 4.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)..... | 86 |
| 4.1.4 pH e Condutividade Elétrica | 88 |
| 4.1.5 Espectroscopia Raman..... | 89 |

| | |
|--|-----|
| 4.1.6 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)..... | 91 |
| 4.1.7 Estimativa de Grupos Ácidos Superficiais | 93 |
| 4.1.8 Determinação do Potencial Zeta..... | 95 |
| 4.1.9 Caracterização Voltamétrica..... | 98 |
| 4.1.10 Conclusões Parciais para a Obtenção de Biochar Ativado..... | 103 |
| 4.2 DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL EM AMOSTRAS DE BIOETANOL COMBUSTÍVEL E ÁGUA RESIDUÁRIA..... | 104 |
| 4.2.1 Comportamento Eletroquímico do EPCM-N2 | 105 |
| 4.2.2 Otimização dos Parâmetros Experimentais para Determinação de Níquel | 109 |
| 4.2.3 Desempenho Analítico do EPCM-N2..... | 113 |
| 4.2.4 Efeito de Espécies Concomitantes | 116 |
| 4.2.5 Determinação de íons Ni(II) em Amostras de Bioetanol e Água Residuária..... | 118 |
| 4.2.6 Conclusões Parciais para a Determinação de Níquel..... | 119 |
| 4.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO EM AMOSTRAS DE VINHO | 120 |
| 4.3.1 Comportamento Eletroquímico do EPCM-N2 | 121 |
| 4.3.2 Otimização dos Parâmetros Experimentais para a Determinação de Ácido Cafeico..... | 123 |
| 4.3.3 Desempenho Analítico do EPCM-N2..... | 126 |
| 4.3.4 Efeito de Espécies Concomitantes | 129 |
| 4.3.5 Determinação de Ácido Cafeico em Amostras de Vinho | 130 |
| 4.3.6 Conclusões Parciais para a Determinação de Ácido Cafeico | 132 |
| 4.4 DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE UTILIZANDO NIOOH SUPORTADO EM BIOCHAR ATIVADO EM UM DISPOSITIVO μ TED | 133 |
| 4.4.1 Comportamento Eletroquímico do EPCM-NiN2 Acoplado ao μ TED ... | 134 |
| 4.4.2 Otimização dos Parâmetros Experimentais para Determinação de Glicose..... | 138 |
| 4.4.3 Desempenho Analítico do EPCM-N2-Ni Acoplado ao μ TED..... | 143 |
| 4.4.4 Efeito de Espécies Concomitantes | 146 |

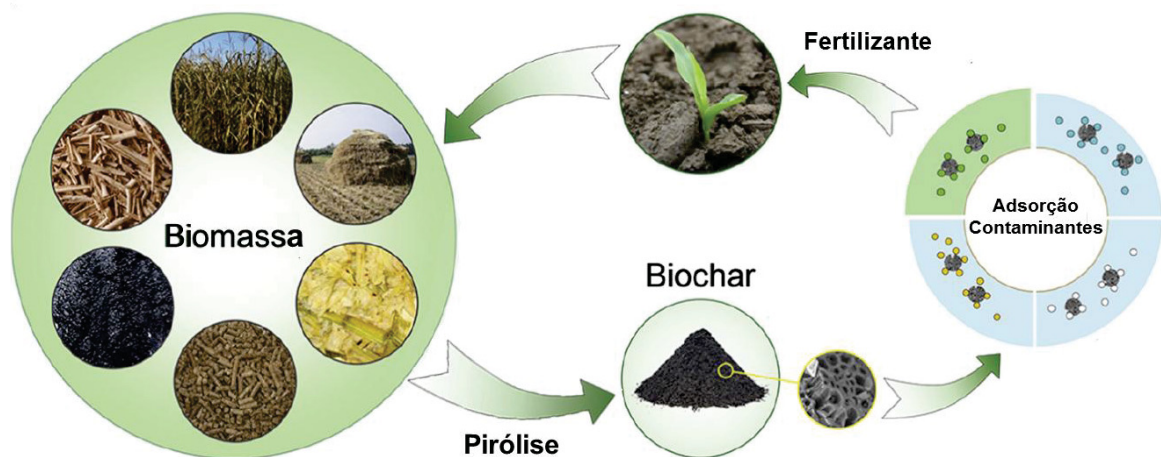
| | |
|--|------------|
| 4.4.5 Determinação Não-enzimática de Glicose em Amostras de Saliva e Soro Sanguíneo Humano..... | 147 |
| 4.4.6 Método Verde (Eco-Escala)..... | 148 |
| 4.4.7 Conclusões Parciais para a Determinação Não-enzimática de Glicose | 150 |
| 4.5 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE UTILIZANDO AZUL DA PRÚSSIA ANCORADO EM BIOCHAR ATIVADO | 151 |
| 4.5.1 Comportamento Eletroquímico do Biossensor EPCM-N2-PB-GOx | 152 |
| 4.5.2 Otimização dos Parâmetros Experimentais para Determinação Enzimática de Glicose | 158 |
| 4.5.3 Desempenho Analítico do EPCM-N2-PB..... | 163 |
| 4.5.4 Efeito de Espécies Concomitantes | 167 |
| 4.5.5 Determinação Enzimática de Glicose em Amostras de Saliva e Soro Sanguíneo | 168 |
| 4.5.6 Conclusões Parciais para a Determinação Enzimática de Glicose..... | 170 |
| 4.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO UMA LÍNGUA ELETRÔNICA VOLTAMÉTRICA..... | 171 |
| 4.6.1 Caracterização Morfológica e Eletroquímica dos Eletrodos..... | 172 |
| 4.6.2 Comportamento Eletroquímico do Arranjo de Sensores..... | 177 |
| 4.6.3 Estudo de Reprodutibilidade..... | 181 |
| 4.6.4 Desempenho Analítico do Arranjo de Sensores | 182 |
| 4.6.5 Análise de Componentes Principais | 184 |
| 4.6.6 Aplicação da Língua Eletrônica Voltamétrica..... | 185 |
| 4.6.7 Conclusões Parciais para a Determinação de Compostos Fenólicos empregando uma Língua Eletrônica Voltamétrica | 187 |
| 5. CONCLUSÃO | 188 |
| REFERÊNCIAS | 191 |
| ANEXO 1 – DISCIPLINAS CURSADAS | 212 |
| ANEXO 2 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA | 213 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOCHAR

O termo *biochar*, ou biocarvão, surgiu da união das palavras *biomass* (do inglês, biomassa) e *charcoal* (do inglês, carvão). Trata-se de um material rico em carbono e obtido a partir do processo de pirólise de biomassa, de origem animal ou vegetal, em baixa ou nenhuma quantidade de oxigênio e temperaturas moderadas (< 700 °C) [1, 2] (FIGURA 1). O processo de obtenção é semelhante ao utilizado para a produção de carvão vegetal. No entanto, a distinção entre o biochar e outros materiais carbonáceos se deve em virtude do biochar ter sido inicialmente produzido visando aplicações na remediação de solo, no sequestro de carbono ou na percolação de água em solo [3, 4]. O uso de biomassa pirolisada em solos surgiu a partir de pesquisas realizadas em um solo amazônico específico, conhecido como “Terra Preta de Índios” (TPI), que apresentava manchas profundas, escuras e altamente férteis. A partir dos anos 2000, pesquisas começaram a ser conduzidas, visando a investigação e produção de um material similar as TPI, dando origem ao biochar [5, 6].

FIGURA 1 – ESQUEMA DE OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOCHAR A PARTIR DE BIOMASSA



FONTE: Adaptado de Tan e colaboradores [7].

Dependendo do material de origem (matéria-prima), o biochar pode apresentar propriedades adsorptivas distintas, e que podem influenciar na capacidade de interação do material, dependendo da aplicação desejada. Tais propriedades podem estar diretamente relacionadas à variações de área superficial, tamanho e volume de poros, quantidades e tipos de grupos funcionais.

Diversas matérias-primas podem ser utilizadas para a obtenção de biochar, dentre estas, destacam-se os resíduos industriais e os rejeitos agrícolas, denotando ao biochar um grande apelo ambiental [8]. Diversos tipos de biomassas são descritas na literatura para a produção de biochar, tais como cascas de amendoim [9] e de coco [10], resíduos de mangue [11], cama de frango [12], resíduos suínos, aviário e leiteiro [13], madeira ou serragem de pinus [14] e eucalipto [15], palhas de trigo [16] e de milho [17], resíduos de mamona [18] e várias outras [8].

A mamona (*Ricinus communis*) é uma oleaginosa tropical que possui grande quantidade de óleo em suas sementes [19], e foi a biomassa escolhida para a produção de biochar neste trabalho. As sementes de mamona são amplamente utilizadas para a extração de óleo vegetal não comestível e rico em ácido ricinoleico, o que torna este processo altamente viável e economicamente vantajoso para a produção de biodiesel, cosméticos, tintas, entre outros [20]. Isso leva a uma elevada produção de mamona, tanto nacional, quanto mundialmente. De acordo com dados obtidos pelo Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA – IBGE), a produção brasileira de mamona registrada no ano de 2018 chegou a mais de 19 mil toneladas [21]. Com isso, tem-se a geração de uma grande quantidade de resíduos que, muitas vezes, não apresentam um destino adequado. Os resíduos de mamona (farelo de mamona) apresentam elevado teor de proteínas, de 34 a 36 %. No entanto, também são altamente tóxicos, devido à presença de toxinas, tal como a ricina [22, 23], que pode ser letal ao homem em doses superiores a $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ [24]. Isso torna o farelo de mamona um resíduo perigoso, e que normalmente é utilizado como fertilizante de solos [22]. Considerando que a gestão de resíduos representa um ônus ambiental significativo, a produção de biochar torna-se uma excelente alternativa para os resíduos de mamona, com um processo de produção simples, de baixo custo, e ecologicamente amigável, permitindo a obtenção de um material estável e com uma ampla gama de aplicações [25].

Após o processo de pirólise, o biochar apresenta um aumento no teor de carbono, e também maior resistência à decomposição (recalcitrante), comparado à biomassa precursora [1]. No entanto, as suas características físico-químicas podem também ser variáveis de acordo com as condições de pirólise utilizadas. Em temperaturas de pirólise moderadas, entre 300 e 500 °C, o biochar ainda apresenta composição predominante de carbono amorfo, com uma superfície altamente funcionalizada, permitindo a sua interação com diversos compostos, como

macromoléculas inorgânicas, moléculas orgânicas, água e íons metálicos [26, 27]. Devido a estas propriedades altamente adsorptivas, o biochar passou também a ser amplamente empregado para a remoção e/ou imobilização de contaminantes ambientais, tais como íons metálicos [28-30] e pesticidas [31, 32], em matrizes aquosas ou em solos [33-35]. A versatilidade do biochar em interagir com espécies orgânicas e inorgânicas está relacionada com a sua porosidade e, principalmente, com a presença de grupos funcionais superficiais. Conseqüentemente, a interação entre o biochar e outras espécies pode ocorrer mediante diferentes mecanismos de interação, tais como [7, 33]:

- Troca iônica, pela troca de íons que naturalmente estão ligados aos grupos funcionais ou óxidos minerais do biochar com íons metálicos contidos no meio;
- Complexação de ânions ou cátions metálicos com os grupos funcionais presentes no biochar, formando complexos metálicos;
- Atração/repulsão eletrostática de compostos carregados com a superfície do biochar, que pode estar negativamente ou positivamente carregada;
- Ligações de hidrogênio pela interação de espécies, geralmente orgânicas, que apresentam grupamentos que permitem tais interações, tais como –OH e –NH₂;
- Adsorção física pela incorporação de espécies em poros ou cavidades existentes na superfície do biochar.

A interação do biochar com outras espécies pode ainda ser melhorada a partir de processos de tratamento de ativação, que promovem a oxidação superficial do biochar e a introdução de mais grupamentos funcionais no material, melhorando assim a sua capacidade de adsorção/interação [36]. Diferentes métodos podem ser empregados para a ativação superficial do biochar, sendo um destes a ativação física, onde as amostras são submetidas a temperaturas elevadas na presença de gases, tais como o dióxido de carbono e nitrogênio [36]. Além deste processo, a ativação química da superfície do biochar é também um método comumente empregado. Para tal, são utilizados agentes químicos que visam à modificação da superfície do biochar, tais como ácido nítrico [37], hidróxido de sódio [38, 39], peróxido de hidrogênio [40], ácido sulfúrico [41], permanganato de potássio [42],

hidróxido de potássio [43]. Além destes, também podem ser utilizadas misturas de agentes oxidantes ou redutores ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, HNO_3/KOH , $\text{HNO}_3/\text{H}_3\text{PO}_4$) [44, 45].

Diversos trabalhos da literatura relatam a introdução de grupos funcionais na superfície de materiais carbonáceos empregando a ativação química [46-48]. Já a utilização de soluções ácidas contribui para a inclusão de grupos funcionais ácidos, como carboxílicos, fenólicos e lactônicos [44, 49]. A formação de grupos funcionais pode ocorrer nas paredes das aberturas dos poros, com isso, além do aumento da quantidade de grupos funcionais tem-se a variação da área superficial e do volume de poros do carbonáceo [46, 50]. Com isso, sítios ativos podem ser formados na superfície do material e podem aumentar a sua capacidade de adsorver/interagir com outros compostos. Isso também pode contribuir para a capacidade de troca catiônica da superfície do biochar, levando em conta o aumento de cargas negativas superficiais, favorecendo interações com cátions metálicos, por exemplo [7, 36].

De acordo com o tipo de tratamento de ativação utilizado, biochar com distintas propriedades físico-químicas e de adsorção poderão ser obtidos [47, 48]. Jaramillo e colaboradores [37] avaliaram a capacidade adsorptiva de diferentes amostras de biochar de sementes de cereja, para a adsorção de íon Cu(II) . Estas amostras foram preparadas com e sem a ativação por diferentes tratamentos físicos e químicos, sendo estes: ar, ar-ozônio, ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. De acordo com os autores, as amostras tratadas com HNO_3 e ar-ozônio apresentaram um aumento de grupos funcionais ácidos contendo oxigênio e, conseqüentemente, apresentaram maior capacidade de adsorção superficial, sendo registrado um valor de íons adsorvidos de 25 mg g^{-1} . Enquanto que a amostra não submetida ao tratamento apresentou um valor máximo de adsorção menor do que $5,0 \text{ mg g}^{-1}$.

Estupiñan e colaboradores [47] relataram o uso de biochar quimicamente ativado com H_2O_2 e HNO_3 para a adsorção de íons Ni(II) em soluções aquosas. Os resultados obtidos indicaram que as amostras tratadas apresentaram maior habilidade para adsorver os íons, comparadas ao biochar não tratado, sendo que essa melhora foi atribuída ao aumento da porosidade e de grupos funcionais oxigenados na superfície do material. Os valores da capacidade máxima adsorvida foram comparados por diferentes modelos de adsorção, onde foram obtidos os valores de $29,7 \text{ mg g}^{-1}$ para o biochar tratado com H_2O_2 e de $51,0 \text{ mg g}^{-1}$ para a amostra submetida ao tratamento com HNO_3 . Os autores sugerem que a elevada

quantidade de grupos ácidos superficiais, com predominância de grupos carboxílicos, favoreceu a adsorção de íons Ni(II) pelo biochar tratado com HNO₃.

Com base no exposto, é observado que a ativação química da superfície do biochar promove o aumento da quantidade de grupamentos funcionais, o que contribui para a capacidade de interação deste material com diferentes espécies, permitindo a sua aplicação eficiente na remoção e/ou imobilização destas. Assim, a melhora das características adsorptivas do biochar evidencia o seu uso em sensores eletroquímicos, visando à imobilização e pré-concentração de espécies de interesse, para posterior determinação voltamétrica destes analitos.

1.2 BIOCHAR NA CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS

1.2.1 Modificação de Eletrodos

Os eletrodos quimicamente modificados (EQM) são amplamente empregados na eletroanalítica, sobretudo, por atribuírem ao eletrodo algumas vantagens, tais como a melhora na transferência eletrônica, seletividade e aumento da capacidade adsorptiva de eletrodos base, o que pode promover o aumento de sensibilidade e detectabilidade destes dispositivos [51, 52]. Contudo, o efeito da superfície também está relacionado com o modificador utilizado, e o tipo de modificação. Diversas técnicas podem ser empregadas para a modificação de eletrodos, tais como adsorção, ligação covalente, filmes poliméricos, materiais compósitos, entre outros [53]. Apesar disso, o uso de eletrodos compósitos mostrou-se mais adequado para o emprego de biochar, o que possibilita a melhor homogeneização do modificador, pela incorporação interna do material eletródico. De maneira geral, os eletrodos compósitos podem ser formados pela mistura de uma fase condutora e uma fase aglutinante, e permitem a preparação de eletrodos de maneira simples e rápida [54, 55].

Dentre este tipo de aplicação, destacam-se os eletrodos de pasta de carbono (EPC), que consistem em eletrodos compósitos e que apresentam baixo custo de fabricação, versatilidade e facilidade de renovação da superfície, uma vez que o material modificador está distribuído homogeneamente da pasta de carbono [56]. Esta estratégia já é relatada na literatura para a incorporação de biochar, visando à construção de sensores eletroquímicos para a pré-concentração e

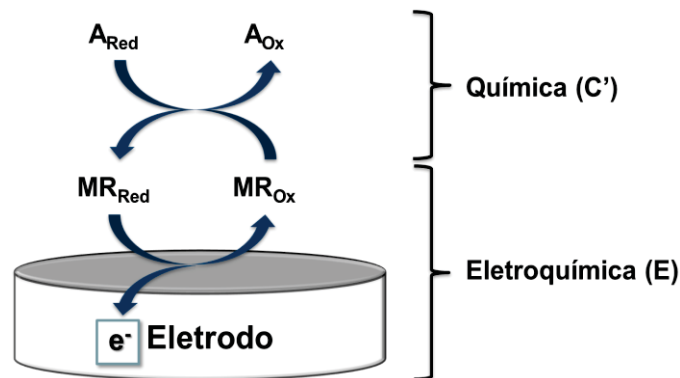
determinação eficiente de íons Cd(II) e Pb(II) em efluentes industriais [57], de íons Cd(II) em amostras de arroz [58] e de íons Cu(II) em bebidas destiladas [59]; de pesticida paraquat em água de coco e água potável [60], metil paration em água potável [61], e detecção de catecol, hidroquinona, e fármacos [62].

Estes exemplos ilustram a eficiência da aplicação de biochar na modificação de sensores eletroquímicos, o que promoveu maior capacidade de interação e pré-concentração das espécies, em comparação ao eletrodo não modificado e a eletrodos modificados com materiais adsorventes mais usuais, tal como o carvão ativado. Contudo, tal aplicação ainda não é relatada para o uso de biochar quimicamente tratado (ativado), o que poderia melhorar ainda mais o desempenho analítico de sensores à base de pasta de carbono modificados com biochar.

Além do uso de biochar para a determinação de espécies de maneira direta, outros trabalhos relatam o uso de biochar para o ancoramento de espécies, visando a determinação do analito. Estas modificações podem melhorar algumas características do eletrodo base, tais como no aumento da área superficial, melhoraria na condutividade elétrica da superfície e na região útil de potencial. Como exemplos, pode-se citar o ancoramento de nanoestruturas de bismuto em biochar para a determinação de íons Pb(II) [63]; de nanogotas de mercúrio para a determinação de zinco [64]; e de nanopartículas de ouro para detecção de hidroquinona e catecol [65].

Levando em conta esta capacidade do biochar de interagir e suportar espécies, torna-se viável o seu uso para ancorar modificadores com propriedades eletrocatalíticas ou mediadores redox. Um exemplo da resposta esperada para estes sistemas está baseado em um mecanismo que envolve uma etapa eletroquímica (**E**) e uma etapa química (**C'**), conhecido como **EC'**, envolvendo um mediador redox (**M**) e um analito (**A**) (FIGURA 2) [66].

FIGURA 2 – ESQUEMA GENÉRICO DO MECANISMO EC' DE UM ELETRODO CONTENDO UM MEDIADOR REDOX PARA A OXIDAÇÃO OU REDUÇÃO DE UM ANALITO



FONTE: O autor (2018).

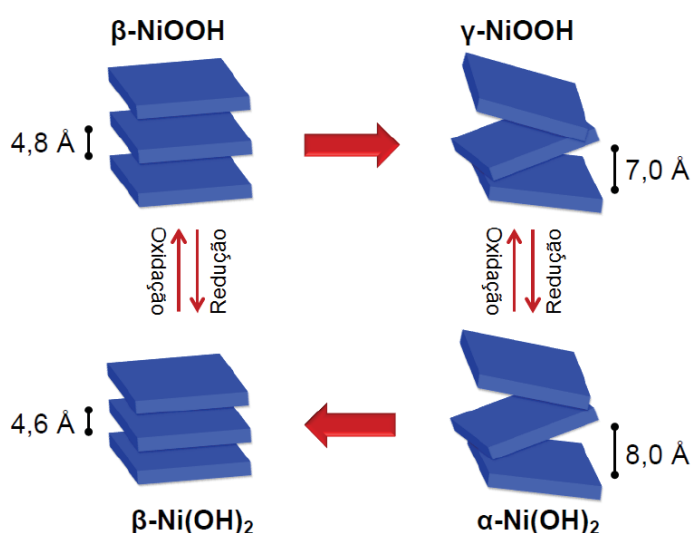
De acordo com esquema apresentado, um eletrodo está modificado com um mediador redox na sua forma reduzida (MR_{Red}). Na primeira etapa, ocorre a formação eletroquímica da forma oxidada do mediador presente na superfície do eletrodo (MR_{Ox}). A partir disso, tem-se a etapa química, onde o a espécie MR_{Ox} é capaz de promover a oxidação química de uma espécie de interesse (analito) que esteja na forma reduzida (A_{Red}), enquanto a espécie do mediador MR_{Red} é regenerada. Com aplicação de potencial suficiente, esta espécie pode ser novamente oxidada, dando sequência ao ciclo eletrocatalítico. O ciclo envolvendo as reações inversas também pode ocorrer, dependendo das reações do analito que se deseja monitorar, e do mediador redox utilizado [67-69].

Diversos materiais podem ser empregados como mediadores redox, tais como polímeros condutores, como o polipirrol [70]; complexos de rutênio [71]; hexacianoferratos metálicos [72]; ftalocianina [73]; e metais, como mercúrio [74] e níquel [75]; entre outros. Dentre estes, os eletrodos à base de níquel vêm sendo empregados desde a década de 1970 para a oxidação de compostos orgânicos, tais como álcoois, amina, glicerol e glicose [76, 77]. Considerando as propriedades eletrocatalíticas do Ni(III), este é amplamente empregado como um modificador de eletrodos, promovendo a eletro-oxidação catalítica do analito, a partir do par redox Ni(II)/Ni(III) [78-80], e permitindo a determinação voltamétrica não-enzimática de espécies [75, 81]. Tais reações ocorrem na interface eletrodo-solução, e baseiam-se em mecanismos de reações químicas acopladas do tipo eletroquímico-químico catalítico, conforme abordado anteriormente.

Neste caso, a etapa eletroquímica, promove a oxidação de espécies de Ni(II) para Ni(III), formando o oxi-hidróxido de níquel. Já na etapa química, a espécie Ni(III), altamente oxidante, possibilita a catálise de reações de outras espécies [68, 82]. O par redox Ni(II)/Ni(III) apresenta processos faradáicos bem definidos e reversíveis, sendo que o processo de oxidação pode ser observado em aproximadamente 550 mV e o de redução em 300 mV (vs Ag/AgCl_{Sat}) [80, 83, 84]. Além disso, ressalta-se que o comportamento eletroquímico dessas espécies depende da morfologia e da estrutura desses compostos [85].

O Ni(OH)₂ apresenta uma estrutura lamelar, e que pode estar organizada de maneiras distintas, tanto no seu estado reduzido, como no oxidado (NiOOH), conforme pode ser observado pelo Diagrama de Bode (FIGURA 3) [86].

FIGURA 3 – DIAGRAMA DE BODE PARA AS FORMAS ESTRUTURAIS DE Ni(OH)₂ E NiOOH



FONTE: Adaptado de Bode e colaboradores [86].

Conforme mostrado na FIGURA 3, o Ni(OH)₂ pode apresentar-se nas fases α e β, e esta conversão pode ocorrer pelo envelhecimento da espécie em meios muito alcalinos, ou pela ciclagem contínua por voltametria cíclica. Sendo que o α-Ni(OH)₂ possui maior desordem e distanciamento interlamelar, apresentando assim melhores propriedades eletroquímicas em comparação à fase β [87]. O NiOOH pode apresentar as fases β e γ, onde a conversão para a espécie γ-NiOOH pode ocorrer pela aplicação de um sobrepotencial positivo, levando ao aumento da distância interlamelar [88].

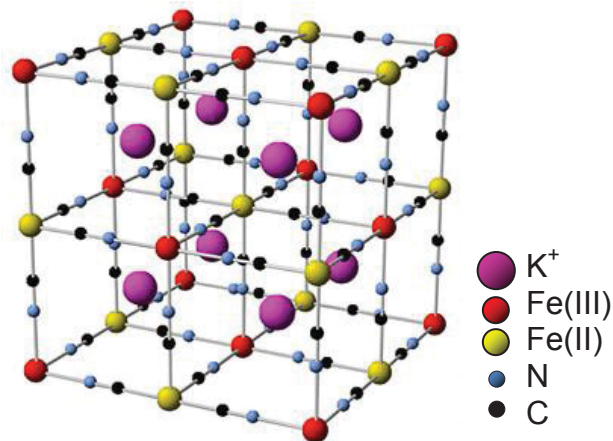
Diversos trabalhos relatam o desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas para a determinação não-enzimática de glicose, empregando mediadores redox a base de níquel. A exemplo disto, Ojani e colaboradores [69] utilizaram um EPCM com níquel/poli-o-aminofenol para a determinação não-enzimática de diversos carboidratos, dentre estes a glicose. Para a incorporação de níquel, o eletrodo modificado com o polímero foi imerso em uma solução contendo $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de íons Ni(II). A presença do polímero permitiu a incorporação de íons Ni(II) e o eletrodo modificado apresentou um comportamento bem definido para o par redox Ni(II)/Ni(III). O dispositivo apresentou-se eficaz para catalisar a oxidação da glicose e de outros carboidratos. A curva analítica foi obtida e apresentou um comportamento linear de $0,10$ a $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$, e limite de detecção de $0,09 \text{ mmol L}^{-1}$.

Em outro trabalho, Ko e colaboradores [89] desenvolveram um sensor não-enzimático para determinação de glicose utilizando um eletrodo de nanodiamante modificado com hidróxido de níquel. A determinação de glicose foi realizada por medidas amperométricas empregando potencial aplicado de $0,50 \text{ V}$. A curva analítica apresentou região linear, de $0,02$ a $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, com limite de detecção de $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$. Segundo os autores, o mecanismo de oxidação eletroquímica da glicose no eletrodo proposto apresentou uma melhora na capacidade eletrocatalítica. Além disso, o sensor apresentou bom desempenho analítico, com elevada seletividade, sensibilidade e estabilidade para medidas em longo prazo.

Os exemplos supracitados demonstram o sucesso da aplicação de eletrodos modificados com NiOOH como sensores não-enzimáticos para a determinação de glicose, devido a elevada capacidade oxidante do Ni(III). Cabe ressaltar que, a construção destes eletrodos só foi possível pelo emprego de outros materiais capazes de suportar o níquel de forma estável.

Uma outra classe de modificadores que se destacam na construção de EQM são os hexacianoferratos metálicos pois, podem atuar como mediadores redox. Dentre estes, o complexo hexacianoferrato de ferro (FeHCF), também conhecido como Azul da Prússia, é um dos mais empregados para esta finalidade [90, 91]. Este composto é formado por centros metálicos de Fe(II) e Fe(III), ligantes CN^- e contra-íons de K^+ , distribuídos nos interstícios da estrutura. A estrutura do Azul da Prússia (PB) apresenta geometria cúbica de face centrada, conforme observado na FIGURA 4 [92, 93].

FIGURA 4 – ESTRUTURA CÚBICA DO HEXACIANOFERRATO DE FERRO (AZUL DA PRÚSSIA)



FONTE: Adaptado de Pintado e colaboradores [94].

Como observado na estrutura da FIGURA 4, o PB apresenta centros metálicos de Fe(II) e Fe(III), sendo capaz de mediar e/ou catalisar reações redox a partir do par Fe(II)/Fe(III). Este complexo de valência mista e, como o nome sugere, exibe uma coloração azul. Quando esta espécie é reduzida, tem-se a formação de um complexo de coloração branca, com centros metálicos apenas de espécies de Fe(II), chamado de branco da Prússia [95]. Esta reação ocorre quando íons K^+ , ou outros cátions com raio hidrodinâmico menor do que 1,6 Å, são difundidos na rede cristalina do PB, reduzindo o complexo e permitindo a oxidação do analito. Quando os centros metálicos possuem apenas espécies de Fe(III), o complexo apresenta coloração verde amarelada, e o composto formado é conhecido como verde de Berlin [93, 96].

A obtenção do complexo PB pode ser realizada por diferentes rotas, sendo as combinações entre ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) e ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$) com espécies de Fe(II) ou Fe(III) as maneiras mais simples [97-99]. Outra rota amplamente utilizada é a eletrossíntese ou síntese eletroquímica [100], que pode ser realizada pela eletrodeposição de PB na superfície de eletrodos, pela aplicação de uma corrente contínua [101], de um potencial constante [102] ou por ciclos voltamétricos consecutivos [103]. Este último método é amplamente empregado no desenvolvimento de sensores eletroquímicos modificados com PB.

Pradela-Filho e colaboradores [104] utilizaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com PB para a determinação amperométrica de nitrito. A presença do PB permitiu ao eletrodo catalisar a reação de redução do nitrito, melhorando a resposta do eletrodo base, principalmente com relação à

sensibilidade. O método FIA foi aplicado com sucesso para a quantificação de nitrito em amostras de água e alimento. Os autores destacaram a facilidade e o baixo custo para a construção do dispositivo EPC-PB, além do baixo consumo de reagentes e elevada velocidade de análise associados ao uso do sistema em fluxo.

Gimenes e Nossol [103] investigaram a formação de filmes de PB em nanotubos de carbono de paredes simples (NTC). Os filmes foram depositados eletroquimicamente por voltametria cíclica, formando um compósito NTC-PB na superfície do eletrodo, e apresentaram elevada estabilidade eletroquímica em meio de KCl. Além disso, os autores consideraram que o procedimento proposto apresentou grande potencialidade para ser aplicado na construção de sensores para determinação de espécies de interesse.

Além dos exemplos citados, merece destaque o uso do azul/branco da Prússia como mediador na redução de H_2O_2 . Diversas enzimas produzem peróxido de hidrogênio como resultado da reação enzimática sobre o substrato o que pode ser detectado com complexo de ferro. Assim, é possível combinar esse mediador com sistemas enzimáticos e expandir seu potencial uso na construção de biossensores.

Os biossensores eletroquímicos são uma subclasse de sensores baseados em elementos de reconhecimento biológico, tais como enzimas, proteínas, anticorpos, células, tecidos ou receptores. Este tipo de sensor apresenta elevada especificidade devido à reação seletiva com o analito [105]. Além disso, os biossensores são cada vez mais visados pela sua potencialidade em diagnosticar problemas e/ou doenças empregando dispositivos com resposta rápida, baixo custo e elevada sensibilidade [106].

Com base nas propriedades físico-químicas do biochar, tais como a elevada funcionalização, biocompatibilidade e atoxicidade, este material apresenta potencialidade para ser aplicado como modificador de eletrodos no desenvolvimento de biossensores. A possibilidade de incorporação de espécies biológicas sobre o biochar é suportada nas estratégias de ancoragem desses materiais, mais precisamente nos tipos de interações químicas existentes entre a espécie biológica e a superfície do eletrodo. A determinação enzimática de glicose normalmente é realizada com utilização de biossensores amperométricos, que podem ser empregados com base em diferentes mecanismos de reconhecimento e respostas.

O uso de biossensores enzimáticos para a determinação de glicose é relatado na literatura empregando as mais variadas configurações de sensores. Este trabalho focou na utilização da enzima glicose oxidase (GOx), uma oxirredutase que apresenta elevada especificidade, estabilidade e baixo custo de obtenção [107, 108]. A GOx, assim como outras enzimas e proteínas, constitui-se de cadeias de aminoácidos que se ligam através de reações com seus grupos de amina primárias ($-NH_2$). Assim, a imobilização da GOx pode ocorrer a partir de ligações com grupos funcionais específicos presentes na superfície do eletrodo, tais como hidroxilas ($-OH$), carbonilas ($C=O$), e carboxilas ($-COOH$). Estes grupos podem ser ativados quimicamente para imobilização da enzima, mantendo a sua atividade enzimática para o desenvolvimento de biossensores [109, 110].

1.3 OUTRAS APLICAÇÕES DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

Dentre as técnicas eletroanalíticas, podem-se citar desde as mais simples, como as voltametrias linear e cíclica, até técnicas mais sensíveis, como as pulsadas. A escolha das técnicas se deve de acordo com os objetivos, e os obstáculos de uma determinação voltamétrica. Sendo que as técnicas pulsadas, como pulso diferencial (DPV) ou onda quadrada (SWV), podem possibilitar melhoras em relação a sensibilidade e limites de detecção, devido a minimização da corrente capacitiva. Neste sentido, outra estratégia empregada para este fim é o método de redissolução ou *stripping* voltamétrico. Estes métodos se baseiam em uma etapa prévia de medida, onde é realizada a pré-concentração do analito sobre a superfície do eletrodo (com ou sem aplicação de potencial elétrico), e em seguida, realiza-se a etapa de medida voltamétrica (varredura do potencial). Outra técnica amplamente utilizada é a amperometria, que consiste na aplicação de um potencial fixo, seguida do monitoramento da corrente em função do tempo. Isso possibilita a sua aplicação em análises em fluxo, onde a passagens do eletrólito suporte ocorre por canais ou caminhos analíticos.

As medidas voltamétricas podem ser realizadas utilizando-se diferentes arranjos de eletrodos, normalmente empregam células eletroquímicas convencionais, constituídas de três eletrodos (trabalho, auxiliar e referência). Contudo, existem outras abordagens onde os sistemas voltamétricos podem ser explorados como adequação a sistemas hidrodinâmicos miniaturizados (dispositivos

microfluídicos) e arranjos combinando mais de um eletrodo de trabalho que podem promover a determinação de analitos simultaneamente, de maneira rápida e precisa. Este conceito de arranjos de sensores é amplamente utilizado para determinações empregando narizes ou línguas eletrônicas.

1.3.1 Dispositivos Microfluídicos

As análises por injeção em fluxo (FIA – Do inglês, *Flow Injection Analysis*) estão entre as mais utilizadas em dispositivos microfluídicos, e se baseiam na injeção de analito em um fluxo contínuo, ou solução transportadora. De maneira simplificada, o analito é transportado pelo caminho analítico até chegar a uma região de detecção. Para as determinações eletroquímicas, um sinal transiente é registrado e relacionado à concentração do analito adicionado [111, 112]. O uso de dispositivos microfluídicos se baseia na utilização de sistemas em fluxo miniaturizados, com canais em dimensões micrométricas, possibilitando a manipulação de quantidades de volumes reduzidos (μL e nL) [113]. A miniaturização apresenta algumas vantagens em relação aos sistemas convencionais de medida, principalmente em relação à possibilidade de portabilidade do sistema (dispositivos *point-of-care*), menor tempo de análise e consumo de reagentes e insumos, e elevada sensibilidade [114, 115].

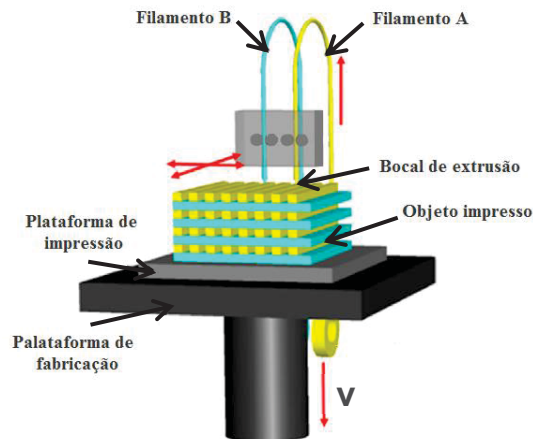
Existe uma grande variedade de dispositivos e sistemas microfluídicos, construídos com diferentes materiais, tais como papéis [116, 117], plásticos [118], vidros [119], polímeros [114, 120], entre outros. Além disso, os dispositivos construídos a base de fibras ou fios têxteis como caminho analítico vem recebendo destaque em aplicações eletroanalíticas, principalmente em virtude da facilidade de fabricação do dispositivo e do baixo custo agregado aos componentes do sistema [121, 122]. Em um trabalho recente, Agustini e colaboradores [122] construíram um sistema microfluídico baseado em fios têxteis (μTED), compostos por placas de vidro sobrepostas, empregando fios de algodão como caminho analítico. Sendo que a passagem da solução de medida ocorreu por capilaridade, sem a necessidade de bombas de propulsão. O dispositivo foi aplicado para a determinação amperométrica simultânea de fármacos, e apresentou elevada detectabilidade e frequência analítica, de 45 injeções por hora. Além disso, segundo os autores o dispositivo também apresentou um baixo custo de fabricação, de US\$ 0,39 por dispositivo.

Em outro trabalho, Carneiro e colaboradores [114] utilizaram um dispositivo microfluídico impresso em 3D, utilizando polímeros termoplásticos em combinação com fios de algodão como microcanais. Um eletrodo impresso foi acoplado ao dispositivo μ TED, visando a determinação amperométrica de compostos fenólicos. Este método também apresentou resultados satisfatórios, com baixos limites de detecção, reprodutibilidade, elevada frequência analítica, sensibilidade e estabilidade. De acordo com os autores, o dispositivo impresso em 3D apresentou facilidade no procedimento de montagem, além de tornar a sua utilização mais acessível a qualquer usuário.

A tecnologia de impressão tridimensional (3D) é uma ferramenta que pode facilitar o processo de fabricação de diversos materiais, permitindo a obtenção de dispositivos microfluídicos de forma rápida, com possibilidade de modulação de formatos e dimensões, e também com a minimização de resíduos gerados [123, 124]. Os dispositivos 3D podem ser obtidos utilizando diferentes métodos, sendo que neste trabalho foi empregada a técnica por modelagem de deposição fundida (FDM – Do inglês, *Fused Deposition Modeling*), mais comumente utilizada para materiais poliméricos [125]. Esta técnica apresenta algumas características como simplicidade operacional, baixo custo de impressão e capacidade de desenvolver plataformas versáteis e miniaturizáveis [126], o que permite que seja amplamente empregada em uma série de aplicações, como na impressão de próteses para usos biológicos e médicos [127, 128]; protótipos e modelos estruturais arquitetônicos [129]; peças para aplicações aeroespaciais [130]; dispositivos eletrônicos e sensores eletroquímicos [114, 124].

Para a construção de dispositivos 3D por FDM, um filamento polimérico é extrusado acima de sua transição vítrea, ou temperatura de fusão, através de um orifício de saída (bocal de extrusão), e depositado camada por camada sobre uma plataforma de impressão. A impressora também apresenta uma segunda plataforma de fabricação que se movimenta em diferentes direções (x, y e z), o que permite a confecção de objetos tridimensionais com formatos e dimensões moduláveis [126, 131, 132]. A FIGURA 5 ilustra um modelo de impressora 3D por FDM, contendo as plataformas de fabricação e impressão, bocal de extrusão por onde saem os filamentos poliméricos e um objeto impresso.

FIGURA 5 – MODELO DE UMA IMPRESSORA TRIDIMENSIONAL (3D) POR MODELAGEM DE DEPOSIÇÃO FUNDIDA (FDM)



FONTE: Adaptado de Wang e colaboradores [126].

Assim, o uso de dispositivos microfluídicos de análise em 3D possibilita a utilização de uma plataforma de determinação com um menor consumo de insumos, devido à miniaturização do sistema. Além disso, a utilização de microcanais promove a passagem da solução carregadora por capilaridade, o que também pode contribuir para a frequência analítica, sem a necessidade de utilização de um sistema externo de propulsão.

Estas características permitem ainda elencar os sistemas microfluídicos de acordo com os “Princípios da Química Verde”, que tem como objetivo o desenvolvimento de métodos ambientalmente mais amigáveis. Dentro deste conceito, espera-se que os métodos analíticos sigam as características ou princípios descritos a seguir [133-135].

1. Aplicação de técnicas analíticas diretas para evitar o tratamento das amostras.
2. Minimização do tamanho e número de amostra.
3. Realização de medidas *in situ*.
4. Integração de processos analíticos e operações para reduzir energia e o uso de reagentes.
5. Automatização e miniaturização de métodos.
6. Evitar a derivatização.
7. Minimizar a geração de resíduos e gerenciar adequadamente os resíduos gerados.

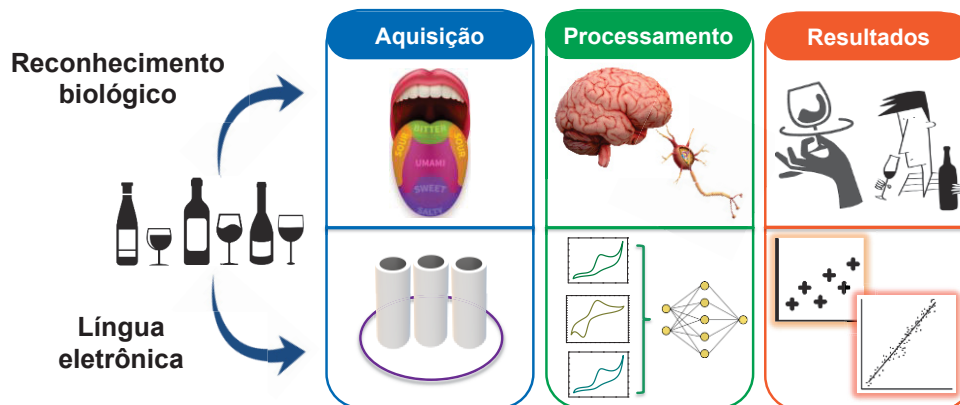
8. Utilizar métodos multianalíticos ou multiparâmetros ao invés de métodos usando um analito de cada vez.
9. Minimizar o uso de energia.
10. Utilizar fontes renováveis de matéria-prima e técnicas economicamente viáveis.
11. Eliminar ou substituir reagentes tóxicos.
12. Aumentar a segurança do operador, para prevenir acidentes.

1.3.2 Línguas Eletrônicas Voltamétricas

As abordagens empregadas em uma ET estão associadas à habilidade do paladar humano em determinar sabores (FIGURA 6). Os receptores gustativos são os responsáveis pela transdução sensorial do paladar, cujo processamento ocorre por meio de sinais sinápticos entre os neurônios [136]. Em analogia, as ET são compostas por um sistema multissensor que consiste por uma série de sensores de baixa seletividade, e que geram informações multidimensionais a respeito dos compostos de interesse [137, 138]. Os sensores empregados podem não identificar uma substância específica, mas responderem a um conjunto de informações de vários analitos, assim como o cérebro humano processa as informações que recebe.

As respostas dos sensores apresentam um padrão de sensibilidade cruzada em relação aos analitos, e que podem ser utilizadas para melhorar a detectabilidade e promover uma seletividade global entre os sensores utilizados, fornecendo padrões para cada analito e/ou amostra [139, 140]. Em relação aos sensores utilizados em uma ET, os eletrodos de pasta de carbono (EPC) apresentam características interessantes como baixas correntes de fundo, versatilidade e simplicidade de construção e/ou modificação, além de baixo custo [55, 141]. Vários trabalhos relatam o uso de EPC não modificados [142, 143] e modificados aplicados em ET [144, 145]. Modificadores como complexos metálicos [146, 147], nanopartículas metálicas [148], polipirrol [149, 150], ftalocianinas [147, 151] e nanotubos de carbono [152] têm sido amplamente relatados para a construção destes dispositivos.

FIGURA 6 – ANALOGIA ENTRE O RECONHECIMENTO BIOLÓGICO GUSTATIVO E O EMPREGO DE UMA LÍNGUA ELETRÔNICA



FONTE: O autor (2019).

Após a aquisição dos dados, empregando diferentes sensores voltamétricos, tem-se uma especificidade parcial para diferentes compostos ou analitos em solução. Estas especificidades podem ser confrontadas, o que acarreta em um “cruzamento de dados”. Assim, procedimentos computacionais avançados (quimiométricos) são normalmente empregados para o processamento destas respostas, e que podem ser baseados no reconhecimento de padrões e/ou na análise multivariada dos dados, permitindo a determinação dos compostos ou amostras [153, 154]. Considerando que o conjunto de sensores pode gerar uma grande quantidade de dados complexos, a aplicação de métodos quimiométricos é essencial e comumente empregada para o processamento de dados [137, 145].

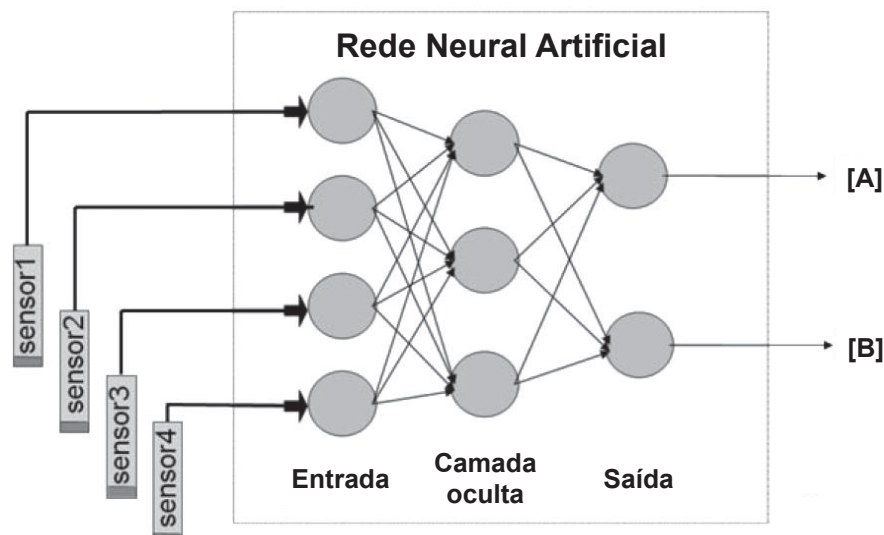
No presente trabalho foram empregadas duas ferramentas quimiométricas: Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*) e Redes Neurais Artificiais (ANN – do inglês, *Artificial Neural Networks*). O PCA é um dos métodos mais importantes utilizados em quimiometria, e pode ser utilizados para o reconhecimento de padrões, além de ser uma maneira de reduzir a matriz de dados multivariados, sem perder informações importantes. O princípio do PCA é que os dados multivariados podem ser decompostos por projeções lineares para um novo sistema de coordenadas. Os novos eixos, conhecidos como componentes principais (PCs), estão orientados de modo que o primeiro PC captura a maior quantidade de variância comum [155]. Basicamente, esta análise pode ser uma maneira de mostrar a complementaridade das informações geradas para cada eletrodo, por exemplo, sendo que se os dados gerados forem redundantes

aparecerão sobrepostos, enquanto respostas diferentes irão se manifestar separadamente, permitindo a discriminação dos resultados [156].

Já a construção de ANNs é baseada nos neurônios biológicos e nos sistemas nervosos, ou seja, nas redes neurais naturais [157]. Este modelo foi proposto por McCulloch e Pitts em 1943 [158], com o intuito de imitar a realidade biológica. As ANNs são compostas por unidades neurais ordenadas em camadas, onde os dados se ajustam a fim de alcançar o objetivo, usando algum tipo de algoritmo de treinamento. Conforme representado na FIGURA 7, os dados de entrada são cruzados e combinados, reproduzindo o sistema biológico, em que os sinais são transmitidos por outros neurônios.

Em geral, os neurônios de entrada não executam nenhum tipo de processamento sobre os sinais que recebem, apenas passam a informação adiante. Cada neurônio de entrada envia sinais para alguns neurônios chamados de escondidos (ou ocultos), e que representam os “interneurônios” do cérebro, que não estão diretamente conectados nem pela entrada, nem pela saída. Por fim, são obtidos os neurônios de saída, onde todas as informações obtidas correspondem a algum tipo de parâmetro [152].

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DOS DADOS DE ENTRADA E DE SAÍDA PARA A APLICAÇÃO DE UMA REDE NEURAL ARTIFICIAL (ANN) EMPREGANDO DIFERENTES SENSORES



FONTE: Adaptado de del Valle e colaboradores [137].

Os erros entre os valores de saída esperados e aqueles obtidos pelo modelo são reduzidos a cada interação, alterando os valores de peso das conexões entre os neurônios. As ANNs podem ser empregadas de acordo com sua configuração específica: número de neurônios, número de camadas na camada oculta, funções de transferência, taxa de aprendizado e erro de treinamento [157]. Além disso, o processamento de um conjunto de sinais voltamétricos com ANNs apresenta elevada dimensionalidade, o que requer o uso de pré-processamentos para a redução de dados. Esses pré-processamentos podem melhorar o tempo de treinamento, evitar a redundância nas informações de entrada, obtendo um modelo com melhor capacidade de processamento [159].

Assim, as ET podem ser aplicadas de maneira qualitativa, para a discriminação entre analitos e/ou amostras, como por exemplo para a distinção e determinação de tipos de vinhos [160], cervejas [161], mel [148], cafés [142] e chás [162]. E também de maneira quantitativa ou multiparamétrica, para a quantificação de parâmetros químicos, o que permite a determinação individual de compostos presentes em uma ou mais amostras de maneira simultânea [163]. Neste sentido, relata-se o uso de ET para as mais diversas aplicações, como para estimar o efeito da idade de vinhos em relação à distinção e quantificação de compostos fenólicos [164]; de diclofenaco em amostras farmacêuticas [152]; de carboidratos em amostras de açúcar [156]; entre outros.

1.4 ANALITOS AVALIADOS

1.4.1 Níquel

O níquel é um elemento pouco tóxico em comparação a outros metais. Contudo, pode causar doenças de pele, reações alérgicas [165], efeitos tóxicos no trato respiratório e no sistema imunológico [166]. Este contaminante pode ser encontrado em combustíveis, tal como o etanol. Isso pode ocorrer tanto pela absorção de metais, pela planta utilizada como matéria-prima, como também durante os processos de produção, armazenamento e transporte do etanol [167, 168]. A maior preocupação diz respeito à contaminação ambiental, onde a presença desta espécie pode afetar negativamente o desempenho do motor, intensificar as propriedades corrosivas do etanol e aumentar os níveis de emissão de poluentes

[167, 169]. A Regulamentação Técnica de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis (ANP 03/2011) [170] determina as características e limites máximos de contaminantes em etanol, entretanto, não há uma especificação para o teor máximo permitido de níquel nesta matriz.

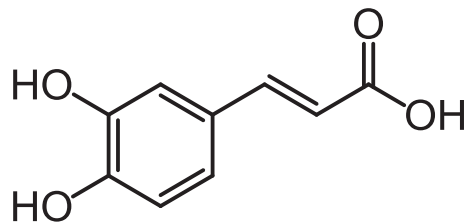
Em relação às matrizes aquosas, a principal fonte de contaminação de níquel consiste na sua presença em tubos e acessórios hidráulicos. Além disso, águas residuais de indústrias podem apresentar elevadas concentrações de poluentes inorgânicos, tal como o níquel. Isso pode ocasionar a contaminação de águas naturais circundantes, como rios, lagos e também fontes d'água subterrâneas, quando descartadas incorretamente [171]. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o teor máximo permitido de níquel em água potável é de $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,19 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) [172]. Já em relação aos padrões de descarte de efluentes, a Resolução do CONAMA 430/2011 estipula que o teor máximo de níquel é de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($34 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) [173].

A determinação de níquel normalmente é realizada pelo uso de técnicas analíticas com elevada sensibilidade, tais como espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e de massa [174], espectrometria de absorção atômica [175, 176], e técnicas eletroquímicas [169, 171]. Com relação a esta última, diversos trabalhos relatam o emprego de técnicas de voltametria de redissolução para o monitoramento do processo de redução de Ni(II) [168, 177]. Esta reação é irreversível e normalmente ocorre em potenciais em torno de $-1,0 \text{ V}$ (vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{Sat}}$) [171]. Com isso, há a necessidade de utilização de eletrodos de trabalho que apresentem uma elevada faixa útil de potencial, sendo os eletrodos a base de mercúrio os mais utilizados [178]. No entanto, o níquel apresenta baixa solubilidade em mercúrio, sendo necessária a utilização de agentes complexantes adicionais. O complexante mais empregado é a dimetilglioxima (DMG), que permite a pré-concentração de íons Ni(II) na superfície eletródica, formando o complexo $\text{Ni}(\text{DMG})_2$. Assim, as medidas voltamétricas são realizadas pelo monitoramento do processo de redução de Ni(II), na sua forma complexada, em uma reação que envolve 2 elétrons [171, 179].

1.4.2 Ácido Cafeico

O ácido cafeico (ácido 3-(3,4-di-hidroxifenil-2-propenóico) (FIGURA 8) é um composto fenólico de origem natural, que possui atividade antioxidante e pode ser encontrado em diversas matrizes, como plantas [180], frutas [181], vegetais [182, 183], e seus derivados [184, 185], entre outros. Os antioxidantes desempenham um papel essencial no organismo humano, uma vez que são os responsáveis por atuar contra os radicais livres, garantindo o equilíbrio entre os seus efeitos benéficos e maléficos [186-188].

FIGURA 8 – ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO CAFEICO



FONTE: O autor (2018).

Os radicais livres de maior ocorrência nos sistemas biológicos são espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Estas espécies são provenientes, principalmente, do mecanismo celular, e quando em excesso atuam de forma maléfica ao organismo dos seres vivos [189, 190]. Entretanto, há outros fatores que potencializam a produção destes radicais como poluição, a radiação UV e alimentação, bem como a existência de alguns processos fisiopatológicos, tais como envelhecimento, obesidade, inflamações, entre outros. Podendo ocasionar em uma série de disfunções e doenças, tal como o câncer [191].

Devido ao seu importante papel antioxidante, os compostos antioxidantes vêm sendo pesquisados a fim de se encontrar métodos para sua quantificação e determinação. A determinação de ácido cafeico pode ser realizada por diversas técnicas, tais como, cromatográficas [192, 193], espectrométricas/colorimétricas [194], voltamétricas [195, 196], entre outras. A quantificação espectrometria de compostos fenólicos totais empregando o reagente de Folin-Ciocalteu é amplamente relatada. O reagente consiste na mistura de ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação +6. Na presença de certos agentes redutores, como os compostos

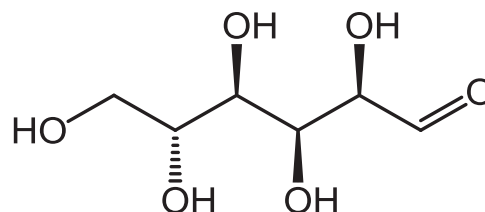
fenólicos, tem-se a formação dos chamados azul de molibdênio e azul de tungstênio [197]. Estes compostos apresentam coloração azul, o que permite a determinação colorimétrica da concentração dos compostos, normalmente utilizando espectrofotômetros na região do UV-Vis [198, 199].

Contudo, as técnicas voltamétricas mostram-se comparáveis em relação às outras técnicas, além de apresentarem algumas vantagens. Neste sentido, podem-se destacar o tempo de resposta mais rápido, quando comparadas ao método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, e o menor custo em relação às técnicas cromatográficas, por exemplo [200, 201]. Diversos trabalhos também relatam a eficiência da determinação voltamétrica de ácido cafeico empregando eletrodos à base de carbono [184, 195]. Neste sentido, a presença de biochar em sensores eletroquímicos pode melhorar a sensibilidade e detectabilidade para a determinação de ácido cafeico, a partir da sua maior capacidade de pré-concentração.

1.4.3 Glicose

A glicose, também chamada de dextrose, é um açúcar simples (monossacarídeo) (FIGURA 9), e um dos responsáveis pelo sabor doce de frutas e vegetais. A glicose também é uma das principais fontes de energia do metabolismo animal, sendo armazenada principalmente no fígado e nos músculos [202].

FIGURA 9 – ESTRUTURA MOLECULAR DA GLICOSE



FONTE: O autor (2018).

Alterações nos níveis de glicose no organismo podem estar diretamente relacionadas ao diabetes *mellitus* (hiperglicemia), uma doença crônica que também provoca anormalidades metabólicas associadas a sequelas vasculares, insuficiência sérica e de insulina [203]. A insulina é um hormônio produzido pelo pâncreas, e que

promove a absorção da glicose nas células. Quando a produção de insulina é insuficiente, tem-se a ocorrência do diabetes Tipo 1. Já a incapacidade do organismo de utilizar a insulina produzida leva ao diabetes Tipo 2 [202, 204]. Nas últimas décadas, os casos da doença cresceram drasticamente, e estima-se que 552 milhões de pessoas serão diagnosticadas pela doença até o ano de 2030 [205, 206]. Além disso, o diabetes é considerado uma das principais causas de morte no mundo [207].

Assim, a quantificação dos níveis de glicose torna-se necessária tanto para o diagnóstico prévio, quanto para o monitoramento do diabetes. Este controle em pacientes com diabetes é tradicionalmente realizado a partir de um método invasivo, pela extração de sangue, utilizando um medidor de glicose portátil [206, 208]. No entanto, recentemente, tem se buscado por métodos de análise menos invasivos, pelo monitoramento em fluídos biológicos, como saliva, lágrimas e suor [209]. Neste sentido, vários dispositivos eletroquímicos têm sido descritos com potencialidade comparável aos medidores de glicose convencionais [210-212].

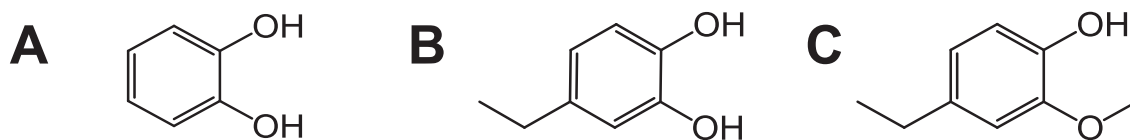
A quantificação dos níveis de glicose pode ser realizada empregando sensores eletroquímicos enzimáticos ou não-enzimáticos, pelo uso de mediadores redox. Neste trabalho, ambas as estratégias foram avaliadas utilizando diferentes sensores e métodos analíticos. A determinação enzimática pode promover maior sensibilidade e detectabilidade aos sensores, apesar de apresentar algumas dificuldades, principalmente no que diz respeito à estabilidade da enzima e a vida útil do eletrodo [213]. Já a determinação não-enzimática muitas vezes é uma opção de baixo custo, levando em consideração o uso da enzima e dos compostos empregados para a sua imobilização no eletrodo.

1.4.4 Catecol, 4-etilcatecol e 4-etilguaiacol

Os compostos fenólicos catecol, 4-etilcatecol e 4-etilguaiacol (FIGURA 10), são amplamente encontrados em plantas, tais como vegetais, chás, tabaco e frutas [214]. Estes são também compostos antioxidantes, constituintes naturais do vinho e de alimentos, fornecendo algumas características intrínsecas de aroma e odor [215]. No entanto, os compostos fenólicos também podem originar aromas desagradáveis, associada à degradação de ácidos hidroxicinâmicos e seus ésteres, pela presença

de leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkeras*, ocasionando o chamado “caráter *Brett*” [216, 217].

FIGURA 10 – ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS CATECOL (A), 4-ETILCATECOL (B) E 4-ETILGUAIAICOL (C)



FONTE: O autor (2018).

Este tipo de contaminação ocorre normalmente nas etapas de fermentação ou de armazenamento dos vinhos, sendo que os esporos destes micro-organismos podem permanecer inativos por longos períodos de tempo, até encontrarem condições favoráveis para proliferação [218]. Alguns autores relatam que a presença destes micro-organismos pode levar aos aromas de “cravo-da-Índia” e “especiarias”, e que são considerados interessantes para realçar a intensidade dos aromas frutados dos vinhos, observados em vinhos dos tipos *Merlot* e *Cabernet*, por exemplo. Contudo, em vinhos com menor estrutura e intensidade de sabor, estes aromas podem ser notados com maior presença [219, 220]. Em concentrações elevadas, estes compostos fenólicos podem causar defeitos organolépticos, originando aromas indesejados descritos como “estrebaria”, “couro” e “fumo” e que acabam afetando a qualidade dos vinhos [221, 222].

A presença destes fenóis torna-se problemática quando a sua concentração excede o valor de $0,50 \text{ mg L}^{-1}$, sendo este o limite inferior em que podem ser detectados pelo sistema gustativo humano [221, 223]. Uma das formas de determinação destes compostos pode ser realizada de maneira preventiva, visando à avaliação do controle de qualidade na produção de vinhos. Este tipo de determinação pode ser realizada por técnicas cromatográficas [224, 225], espectrométricas [226, 227], colorimétricas [228, 229], e voltamétricas [230, 231]. Neste trabalho, a determinação simultânea de polifenóis catecol, 4-etilcatecol e 4-etilguaiacol foi realizada empregando a técnica de voltametria cíclica, utilizando três eletrodos à base de carbono, em uma língua eletrônica voltamétrica.

Considerando o exposto até o momento, é evidente que o uso de materiais adsorventes vem se destacando em uma série de aplicações, dentre elas, a construção de sensores eletroquímicos. Diversos materiais têm sido propostos e estudados visando avaliar o desempenho de novos adsorventes que apresentem menor custo agregado e capacidade sortiva. Além disso, tem se optado pela busca de materiais adsorventes localmente disponíveis e/ou presentes como resíduos de outras atividades agrícolas ou industriais. Permitindo assim, a reutilização de materiais sem destino apropriado, por exemplo. Neste contexto, diversos materiais podem ser utilizados por se assemelham as características provenientes do carvão ativado, tais como zeólitas, quitosana, e biochar.

Este último foi escolhido como objeto de estudo para o presente trabalho, onde foram avaliadas diferentes condições de ativação química, utilizando HNO_3 e /ou H_2O_2 , visando a melhora das propriedades sortivas do biochar. Os materiais obtidos foram utilizados na modificação e desenvolvimento de sensores eletroquímicos, objetivando a melhoria da pré-concentração de espécies de interesse para posterior determinação empregando a técnica de *stripping* voltamétrico. Com o intuito de explorar a versatilidade e potencialidade do biochar na construção de eletrodos de pasta de carbono, diferentes estratégias de aplicações foram avaliadas em função do seu desempenho analítico para a determinação de espécies de interesse, inorgânicas e orgânicas. Assim, este trabalho aborda a obtenção, caracterização e aplicação de Biochar Ativado como modificador de eletrodos visando o desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação de espécies de interesse ambiental, industrial, biológico e alimentício.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Preparar e caracterizar biochar ativado a partir de farelo de mamona. Avaliar a potencialidade analítica de eletrodos modificados com o biochar quimicamente ativado no desenvolvimento de sensores voltamétricos para a determinação de espécies de interesse em diferentes amostras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar amostras de biochar quimicamente ativado com ácido nítrico e/ou peróxido de hidrogênio, sob diferentes condições experimentais, caracterizar as amostras e avaliar a influência de cada estratégia de ativação na pré-concentração e detecção de espécies inorgânicas e orgânicas;
 - Avaliar a capacidade de pré-concentração de íons níquel (II) empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar ativado. Desenvolver uma metodologia analítica alternativa para a determinação de íons níquel (II), pelo monitoramento dos processos de oxirredução do par Ni(II)/Ni(III), visando a determinação em amostras de água potável e bioetanol combustível;
 - Avaliar a capacidade de pré-concentração e determinação voltamétrica de ácido cafeico empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar ativado, visando a determinação em amostras reais de vinhos;
 - Avaliar a potencialidade analítica de um eletrodo de pasta de carbono com NiOOH suportado em biochar ativado na oxidação de glicose, acoplado em um dispositivo microfluídico baseado em fios têxteis (μ TED), e desenvolver uma metodologia analítica para a determinação não-enzimática de glicose em amostras biológicas;
 - Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação enzimática de glicose em amostras biológicas, empregando um biossensor baseado na incorporação de enzima glicose oxidase e Azul da Prússia sobre biochar ativado;
 - Aplicar um conjunto de EPC e EPCM com nanotubos de carbono e biochar ativado em uma língua eletrônica voltamétrica, para a determinação simultânea de compostos fenólicos catecol, 4-etil catecol e 4-etil guaiacol.
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS



3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados durante a realização das atividades apresentados nesta tese estão sumarizados na TABELA 1. Todas as diluições foram realizadas utilizando água ultrapura Milli-Q (Direct-Q3, Millipore), com resistividade maior do que $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

TABELA 1 – REAGENTES UTILIZADOS PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES

| Reagente | Marca | Pureza (%) |
|---|---------------|------------------------|
| Acetato de sódio anidro P.A. | Vetec | 99,0 – 101 |
| Ácido acético glacial P.A | Neon | ≥ 99,9 |
| Ácido ascórbico | Sigma Aldrich | ≥ 99,0 |
| Ácido clorídrico P.A. | F.Maia | 37,0 |
| Ácido sulfúrico P.A. | Proquímicos | 95,0 – 98,0 |
| Ácido úrico | Sigma-Aldrich | ≥ 99,0 |
| Bicarbonato de sódio P.A. | Vetec | 99,7–100 |
| Brometo de potássio P.A. | Aldrich | 99,9 |
| Carbonato de sódio P.A. | Synth | 99,5 |
| Cloreto de cálcio P.A. | Vetec | 96,0 |
| Cloreto de ferro (III) P.A. | Synth | 98,0 |
| Cloreto de potássio P.A. | Biotec | 99,5 |
| Cloreto de sódio P.A. | Reagen | 99,0 |
| Cloreto de zinco P.A. | Impex | 97,0 |
| D-(+)-Glicose anidra P.A. | Sigma Aldrich | ≥ 99,5 |
| EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) | Sigma Aldrich | 97–99 |
| Ferricianeto de potássio | Vetec | 98,5–102 |
| Fosfato de potássio monobásico P.A. | Vetec | 99,5 |
| Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. | Vetec | > 99,0 |
| GOx purificada de <i>Aspergillus niger</i> | Sigma-Aldrich | 150 U mg ⁻¹ |
| Hidróxido de sódio P.A. | Cromato | 99,5 |
| NHS (N-hidróxisuccinimida) | Sigma Aldrich | 98,0 |
| Padrão de cádmio (II) | Merck | ≥ 99,0 |
| Padrão de chumbo (II) | Merck | ≥ 99,0 |
| Padrão de cobre (II) | Merck | ≥ 99,0 |
| Paraquat | Sigma Aldrich | ≥ 99,0 |
| Sacarose P.A. | Synth | 99,0 |

3. 2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR ATIVADO

O preparo da amostra de biochar precursora foi realizado no Laboratório de Processos e Projetos Ambientais (LabPPAm) da Universidade Federal do Paraná, coordenado pelo Professor Dr. Antonio Salvio Mangrich, utilizando como matéria-prima (biomassa) o farelo de mamona. Este é um material obtido a partir de rejeitos indústrias na produção de óleo vegetal, e que já é empregado na produção de biochar [232]. Inicialmente, o farelo de mamona passou por um processo de homogeneização do tamanho das partículas, para isso, a biomassa foi colocada em um moinho de bolas (bp Engenharia CB2-T), durante 1,0 hora. A seguir, utilizando peneiras foram obtidas amostras com granulometria entre 40 e 80 mesh. As amostras foram submetidas ao processo de pirólise sob condições controladas, sendo estas: tempo de permanência de 60 min, rampa de aquecimento de $5,0 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e temperatura final de $400 \text{ }^\circ\text{C}$. Estas condições foram escolhidas pelo fato de terem apresentados, em trabalhos anteriores, resultados satisfatórios para a avaliação voltamétrica, empregando eletrodos modificados com biochar [57, 233].

Após a etapa de pirólise, o biochar precursor (BC) foi submetido a diferentes processos de tratamento superficial por ativação química, visando a incorporação de grupos funcionais e, conseqüentemente, o aumento da capacidade adsortiva do material para a pré-concentração dos analitos. Para isso, uma solução de 50 mL do agente oxidante (ácido nítrico e/ou peróxido de hidrogênio) foi adicionada a 1,0 g de biochar precursor. As dispersões foram colocadas em um sistema de refluxo, sob agitação constante, empregando diferentes condições [47, 234, 235]. Para as amostras tratadas com ácido nítrico 50 % (v/v), foram avaliadas as temperaturas de 60 e 90 $^\circ\text{C}$ e os tempos de refluxo de 1,0 e 3,0 horas, obtendo-se as amostras designadas como N1, N2, N3 e N4. Com o propósito de verificar a influência da concentração do agente oxidante (HNO_3), uma 5ª amostra (N5) foi preparada, fixando a condição de refluxo a 60 $^\circ\text{C}$ durante 1,0 h, e empregando-se HNO_3 75 % (v/v). Amostras H1 e H2 foram tratadas com H_2O_2 , a 40 $^\circ\text{C}$ durante 1,0 e 2,0 horas, respectivamente. Por fim, foi investigada a influência de um tratamento misto, com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1), sendo

obtida a amostra NH. Após a etapa de ativação, a mistura foi filtrada, lavada com água destilada, seca em estufa a 100 °C durante 24 horas, e os materiais obtidos foram armazenados para posterior uso como agentes modificadores de eletrodos. Assim, foram obtidas oito amostras de biochar ativado, em diferentes condições de tratamento, conforme descrito na TABELA 2.

TABELA 2 – CONDIÇÕES DE TRATAMENTO UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR ATIVADO

| Amostra | Agente Oxidante | Condição de Refluxo | |
|---------|---|---------------------|-----------|
| | | Temperatura (°C) | Tempo (h) |
| N1 | HNO ₃ 50 % (v/v) | 60 | 1,0 |
| N2 | | 60 | 3,0 |
| N3 | | 90 | 1,0 |
| N4 | | 90 | 3,0 |
| N5 | HNO ₃ 75 % (v/v) | 60 | 1,0 |
| H1 | H ₂ O ₂ 35 % (P.A.) | 40 | 1,0 |
| H2 | | 40 | 2,0 |
| NH | HNO ₃ /H ₂ O ₂ 1:1 (v/v) | 60 | 1,0 |

A amostra BC e também as amostras tratadas quimicamente foram caracterizadas por técnicas estruturais e morfológicas, sendo estas: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), Análise Termogravimétrica (TGA), pH e condutividade, Espectroscopia Raman, Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Titulação de grupos ácidos pelo método de Boehm, Potencial Zeta e Avaliação superficial pelo método proposto por B.E.T. (Brunauer, Emmett e Teller). As análises foram realizadas utilizando o parque instrumental do Centro de Microscopia Eletrônica (CME-UFPR), e do Departamento de Química da UFPR (DQ-UFPR).

Medidas MEV foram realizadas para verificação estrutural das superfícies dos materiais. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM-6360LV. Para uma análise da estimativa da composição elementar semi-quantitativa das referidas amostras foram realizadas análises de EDS. Os espectros foram obtidos com um espectroscópio Thermo, modelo 200, acoplado ao microscópio eletrônico de varredura.

Caracterizações por TGA foram conduzidas para avaliar as perdas de massa relacionadas ao biochar antes e após os tratamentos de ativação. Para isso, utilizou-se um analisador térmico Netzsch STA 449F3, em atmosfera de nitrogênio. As análises foram realizadas com taxa de aquecimento de $5,0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, até temperatura final de $1.000\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para verificar o pH e a condutividade elétrica, as amostras de biochar foram dispersadas em água deionizada na proporção de 1,0:20 (m/v), e permaneceram sob agitação constante durante 1,0 hora. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando um pHmetro Metrohm, modelo 780 e um condutímetro Sensortechnik Meinsberg, modelo LF 37.

Alguns trabalhos associam a formação de grupos funcionais com o grau de defeitos de uma amostra, desta forma, análises de Espectroscopia Raman também foram realizadas com a finalidade de estimar o grau de defeitos gerados após os tratamentos de ativação. Esta estimativa foi feita pela correlação entre as intensidades de bandas de grafitação (banda G) e de "desordem" (banda D) dos materiais submetidos aos tratamentos químicos, tal como o BC. Um microscópio Witec Alpha 300R foi utilizado para as análises, empregando um laser de 532 nm , com uma potência de $1,5\text{ mW}$.

Medidas de FTIR foram realizadas com o objetivo de elucidar quais os tipos de grupos funcionais que estão presentes na superfície das amostras de BC e após a ativação química. Para a realização das análises, $1,0\text{ }\%$ (m/m) de amostra de biochar foi homogeneizado com brometo de potássio (KBr), a mistura foi prensada com auxílio de uma prensa hidráulica para obtenção de pastilhas de análise. As medidas foram feitas em um espectrofotômetro BOMEM MB100, na região de $4.000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$, e os espectros foram coletados após 64 scans .

A estimativa de grupos ácidos superficiais das amostras de biochar foi realizada por titulações potenciométricas empregando o método proposto por Boehm [236, 237], que consiste basicamente em uma titulação ácido-base. Foram quantificados os grupamentos de ácidos totais (carboxílicos, fenólicos e lactônicos) através do procedimento de retrotitulação, utilizando NaOH para neutralização dos grupamentos ácidos. Inicialmente, 50 mg de amostra foram dispersas em $5,0\text{ mL}$ de base padronizada ($\text{NaOH } 0,10\text{ mol L}^{-1}$). A mistura foi mantida sob agitação constante durante 24 horas e, posteriormente, filtrada. Ao

filtrado adicionou-se um excesso de HCl (10 mL de solução 0,10 mol L⁻¹). Em seguida, realizou-se a titulação potenciométrica utilizando NaOH como solução titulante. As análises foram realizadas utilizando um eletrodo combinado de vidro acoplado em um pHmetro Metrohm, modelo 780. Com base nas curvas titulométricas obtidas, foram calculadas as quantidade de grupos ácidos totais de cada amostra, em equivalente por grama de biochar.

O potencial zeta está relacionado à carga superficial da partícula e foi usado para prever as características de sorção das amostras de biochar. Para isso, 5,0 mg de amostra foram dispersos e agitados em 50 mL de solução de KCl 0,01 mol L⁻¹ utilizando uma incubadora de agitação a 150 rpm, durante 24 h. Em seguida, as amostras foram analisadas em um titulador Microtrac Stabino Particle Charge Mapping, que a partir de uma frequência de oscilação da solução contendo biochar, cria uma diferença de potencial de fluxo. Alíquotas de soluções de HCl e NaOH 0,01 mol L⁻¹ foram adicionadas a cada 200 s para ajustar os valores de pH entre 3,0 e 8,0. A partir deste estudo foram obtidos os potenciais zeta e os pontos isoelétricos das amostras.

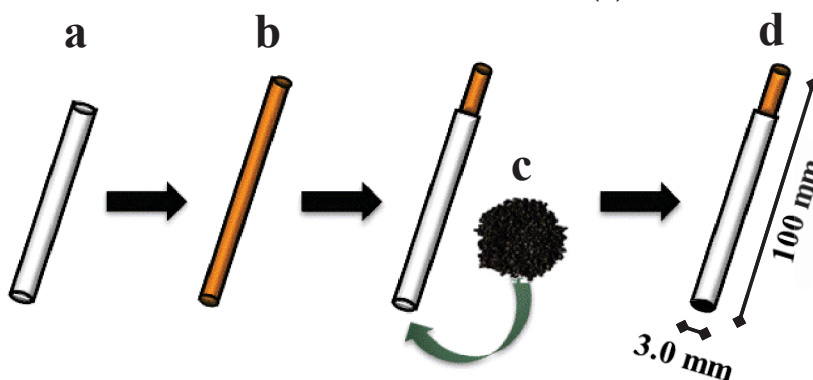
A caracterização morfológica do biochar precursor também foi realizada em comparação a uma das amostras tratadas, onde foram obtidas informações a respeito da área superficial e da porosidade das amostras empregando o método proposto por B.E.T. (Brunauer, Emmett e Teller), utilizando um porosímetro New 1200, com sorção de nitrogênio gasoso.

3.2.1 Construção de Eletrodos

Os eletrodos de pasta de carbono modificados (EPCM) foram preparados pela compactação da pasta de carbono modificada com biochar, composta por 25 % (m/m) de óleo mineral (Sigma Aldrich®), 60 % (m/m) de grafite (Sigma Aldrich®) e 15 % (m/m) de agente modificador (biochar). Eletrodos sem modificação (EPC) foram também preparados em uma proporção de 25 e 75 % (m/m) de óleo mineral e grafite, respectivamente. Os componentes foram homogeneizados com almofariz e pistilo, e a pasta foi compactada em um suporte de eletrodos. Foram utilizadas três configurações diferentes de eletrodos, de acordo com os métodos analíticos desenvolvidos no presente trabalho.

Conforme apresentado na FIGURA 11, o primeiro eletrodo utilizado foi baseado em um suporte de PVC, com diâmetro interno de 3,0 mm (a). Uma haste de cobre foi utilizada como contato elétrico e também como êmbolo para compactação da pasta no dispositivo (b, c). O eletrodo pronto para uso apresentou dimensões de 100 mm de comprimento, com diâmetro de aproximadamente 3,0 mm (d). Para o emprego deste eletrodo, uma célula eletroquímica convencional de três foi utilizada, composta por eletrodos de referência de Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹ e auxiliar de platina. Esta configuração foi utilizada nas etapas descritas pelas seções 3.2.2 Caracterização Voltamétrica dos EPCM com Biochar Ativado; 3.3 Determinação de níquel; 3.4 Determinação de ácido cafeico e 3.6 Determinação enzimática de glicose.

FIGURA 11 – COMPONENTES UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DOS EPC, CONTENDO SUPORTE DE PVC (a) COM HASTE DE COBRE PARA CONTATO ELÉTRICO (b), E A PASTA DE CARBONO (c) INCORPORADA A EXTREMIDADE DO ELETRODO. CONFIGURAÇÃO FINAL DO EPC, PRONTO PARA USO (d)

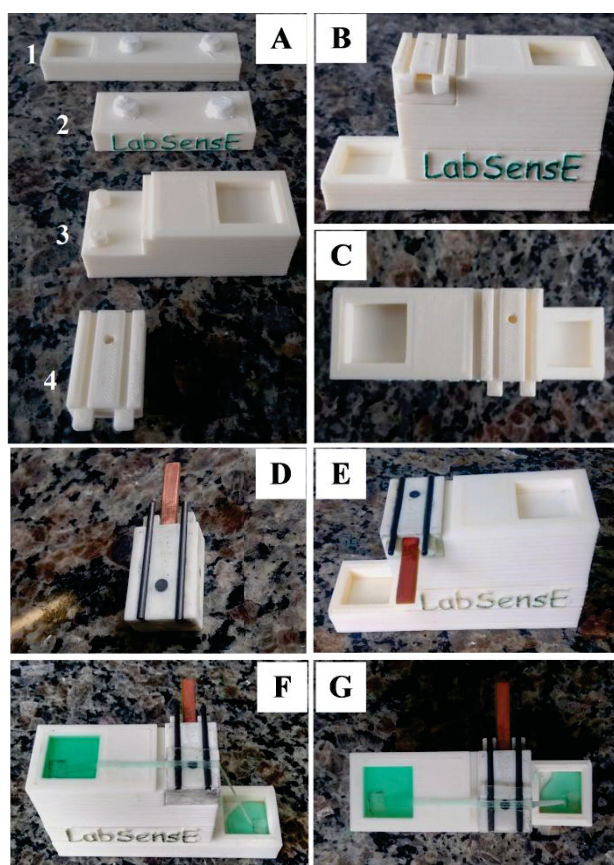


FONTE: O autor (2015).

Para os estudos de determinação não-enzimática de glicose (seção 3.5), utilizou-se um sistema microfluídico baseado em fios têxteis (μ TED), em que o eletrodo de trabalho consistiu em um EPCM modificado com oxi-hidróxido de níquel suportado em biochar ativado. A estrutura do dispositivo foi confeccionada em polímero ABS (Acrilonitrilo-Butadieno-Estireno), empregando a técnica por modelagem de deposição fundida (FDM), em uma impressora tridimensional GTMax-3D. A configuração do dispositivo seguiu o modelo otimizado e desenvolvido por Agustini e colaboradores [122].

A FIGURA 12 apresenta a sequência de montagem do dispositivo μ TED. Primeiramente, quatro placas de 10 mm altura foram impressas em 3D (A) e montadas para a construção do dispositivo (B-C). Em seguida, os eletrodos foram acomodados à peça de número 4 (zona de detecção), sendo utilizados dois grafites cilíndricos como eletrodos auxiliar e de pseudo-referência e o EPCM como eletrodo de trabalho, onde a pasta foi compactada sobre uma placa de cobre metálico, utilizada como contato elétrico (D), e a peça foi então acoplada ao dispositivo μ TED (E). Finalmente, nove fios de algodão foram alinhados e fixados sob o dispositivo, do reservatório de entrada até o de saída, utilizando fitas de dupla face (F-G).

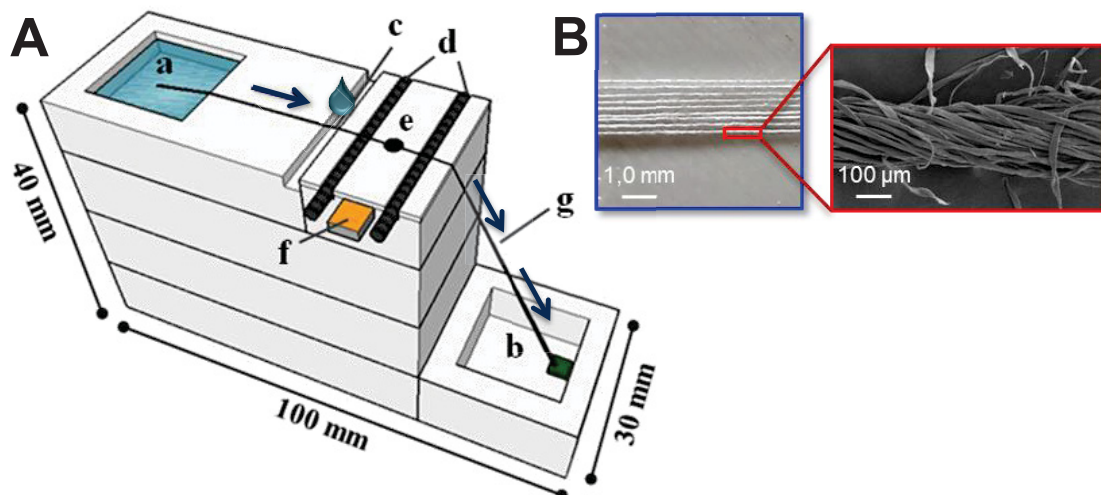
FIGURA 12 – PROCEDIMENTO DE CONSTRUÇÃO DO SISTEMA MICROFLUÍDICO (μ TED), COM OS COMPONENTES E AS ETAPAS DO PROCESSO DE MONTAGEM



FONTE: O autor (2017).

O dispositivo pronto para uso apresentou dimensões de 40 mm de altura, 100 mm de comprimento e 30 mm de largura, conforme ilustrado na FIGURA 13-A, e que será utilizada para demonstrar o funcionamento do μ TED.

FIGURA 13 – COMPOSIÇÃO DO DISPOSITIVO μ TED (A): RESERVATÓRIOS DE ENTRADA (a) E SAÍDA (b), ZONA DE INJEÇÃO (c), ELETRODOS DE GRAFITE (d), ELETRODO DE TRABALHO (e) COM O CONTATO ELÉTRICO (f), E CAMINHO ANALÍTICO DE FIOS TÊXTEIS (g). DETALHE DO ALINHAMENTO DOS FIOS, E IMAGEM DE MEV DE UM FIO DE ALGODÃO, COM AUMENTO DE 200 VEZES (B).



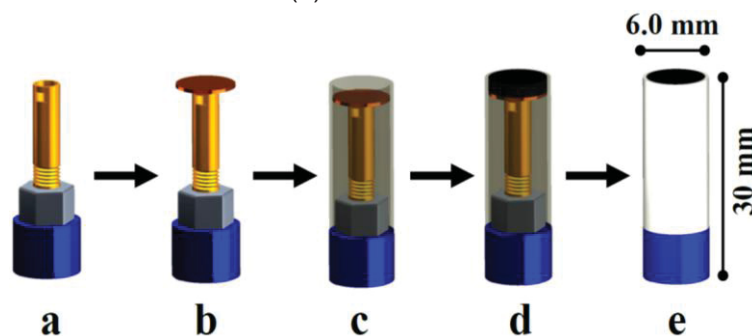
FONTE: O autor (2017).

Inicialmente, a solução transportadora (eletrólito suporte) foi adicionada ao reservatório de entrada, com volume de 2,0 mL (a), e seguiu pelo caminho analítico formado pelos fios de algodão. O fluxo da solução ocorreu por capilaridade e gravidade, até chegar ao reservatório de saída (b). O transporte da solução ocorre primeiramente por capilaridade, pelo preenchimento das fibras de algodão, e também pelo fluxo entre os fios [238]. Em seguida, tem-se a contribuição pela ação da gravidade, devido à diferença de altura entre os dois reservatórios. Alíquotas de analito, com volume de 2,0 μ L, foram adicionadas em na região de injeção, composta por uma cavidade de 3,0 mm de largura, situada a 10 mm do eletrodo de trabalho (c). A glicose foi então transportada juntamente com o eletrólito pelo fluxo até o reservatório de saída, passando pela zona de detecção, com dimensões de 20 mm x 30 mm. A região de detecção foi composta por duas cavidades para acomodação dos eletrodos auxiliar e de pseudorreferência, constituídos de grafites cilíndricos (comprimento de 35 mm e diâmetro de 2,0 mm) (d); e um orifício ($\varnothing = 3,0$ mm) para compactação da pasta de carbono (EPCM-N2) (e). Para o contato elétrico do eletrodo de trabalho utilizou-se uma placa de cobre de 35 mm de comprimento e 6,0 mm de largura, inserida abaixo da cavidade destinada para o referido eletrodo (f). Ao passar pela zona de detecção, ocorrem as reações relacionadas à oxidação do níquel(II) e da

glicose, e era realizado o monitoramento do sinal transiente, proporcional à concentração adicionada. As medidas foram realizadas por amperometria, em que a perturbação é feita pela aplicação de um potencial fixo, suficiente para promover a oxidação do níquel(II), e a resposta é coletada na forma de corrente. O caminho analítico foi constituído por nove fios têxteis de algodão, que foram alinhados e sobrepostos ao dispositivo (g). Detalhes do alinhamento dos fios podem ser observados na FIGURA 13-B, bem como uma imagem de MEV de um dos fios de algodão, obtida com aumento de 200 vezes.

Já para a última estratégia abordada neste trabalho, determinação de compostos fenólicos empregando uma língua eletrônica voltamétrica (seção 3.7), utilizou-se um arranjo de três eletrodos de trabalho a base de pasta de carbono, sendo estes: um eletrodo não modificado (EPC) e dois eletrodos modificados, um com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (EPCM-NTC) e outro com biochar ativado N₂ (EPCM-N₂). A preparação das pastas de carbono foi realizada conforme abordado anteriormente, e também foram utilizados eletrodos de referência de Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹ e auxiliar de platina. A construção dos eletrodos, ilustrada na FIGURA 14, foi realizada pelo encaixe de uma haste de cobre em um conector (a); um disco de cobre ($\varnothing = 5,0$ mm) foi soldado à haste para o contato elétrico do eletrodo (b). Subsequentemente, um suporte de PVC foi encaixado sob o conector (c) de modo que houvesse um espaço de 2,0 mm entre a superfície do suporte e o contato do disco de cobre. Por fim, a pasta de carbono foi compactada neste espaço (d). O eletrodo pronto para uso apresentou dimensões de 6,0 mm de diâmetro e 30 mm de comprimento (e).

FIGURA 14 – PROCEDIMENTO DE CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS, COMPOSTOS POR UMA HASTE DE COBRE ACOPLADA A UM CONECTOR (a); FIXAÇÃO DO DISCO DE COBRE ($\varnothing = 5,0$ mm) (b); MONTAGEM DO SUPORTE DE PVC NO CONECTOR (c), COMPACTAÇÃO DA PASTA DE CARBONO (d) E ELETRODO PRONTO PARA USO (e)



FONTE: O autor (2018).

3.2.2 Caracterização Voltamétrica dos EPCM Com Biochar Ativado

As amostras de biochar precursor e ativado foram incorporadas como modificadores de eletrodos de pasta de carbono (EPCM), visando à investigação de sua capacidade de pré-concentração de diferentes espécies eletroativas. As medidas voltamétricas utilizando estes eletrodos foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab, gerenciado pelo programa computacional NOVA 1.10.5. Inicialmente, as medidas foram realizadas para avaliar a potencialidade dos eletrodos propostos em pré-concentrar diferentes espécies, inorgânicas e orgânicas, sendo estas: íons Pb(II), Cd(II) e Cu(II), e os pesticidas paraquat e metil paration. Os referidos compostos foram escolhidos em virtude de terem apresentado capacidade de interagir físico-quimicamente com o biochar precursor (não ativado) presente em EPCM, conforme comprovado em estudos anteriores [57, 60, 233, 239]. Os procedimentos voltamétricos seguiram os parâmetros experimentais e instrumentais otimizados nestes trabalhos, e foram realizados em três etapas, para os compostos inorgânicos e orgânicos, conforme descrito a seguir e apresentado na FIGURA 15.

- **(1) Etapa de Pré-Concentração:** Primeiramente, foi realizada uma etapa de pré-concentração espontânea, em condição de potencial de circuito aberto, para cada espécie individualmente. Os eletrodos foram colocados em uma solução de acetato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, com pH ajustado em 5,0, sob agitação constante durante 5 minutos.

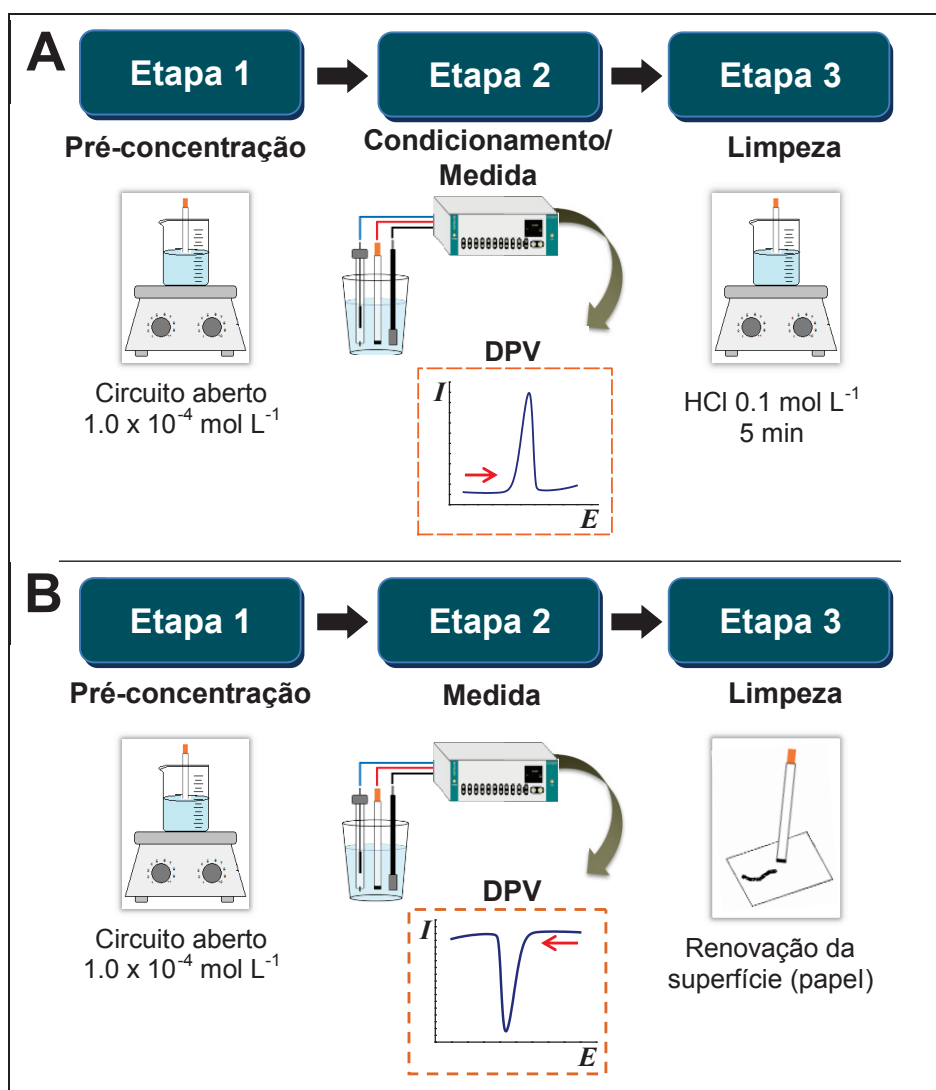
- **(2) Etapa de Condicionamento e Medida:** Após a etapa de pré-concentração, foram os eletrodos introduzidos na célula eletroquímica e diferentes procedimentos foram utilizados para avaliar as espécies:

Íons Pb(II), Cd(II) e Cu(II): Após a incorporação dos íons, uma etapa prévia à etapa de medida foi realizada para promover a redução destes íons, aplicando-se um potencial de $-1,0 \text{ V}$ durante 120 s. Em seguida, foram realizadas medidas por voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*), para monitorar a oxidação dos íons, empregando as seguintes condições: amplitude de pulso de 100 mV, tempo de pulso de 25 ms e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Faixa de varredura do potencial de $-1,0$ a $-0,2 \text{ V}$ para íons Pb(II) e Cd(II), e de $-0,3$ a $0,3 \text{ V}$ para íons Cu(II).

Pesticidas PQ e MP: Os pesticidas foram determinados pelo monitoramento das reações de redução, empregando a técnica de DPV nas seguintes condições: amplitude de pulso de 25 mV, tempo de pulso de 25 ms e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Faixa de varredura do potencial de -0,2 a -1,0 V para o MP.

(3) Limpeza: A última etapa conduzida foi a limpeza dos eletrodos. Para os íons metálicos o eletrodo foi colocado em solução contendo HCl 0,10 mol L⁻¹, e permaneceu sob agitação durante 5 minutos. Para os pesticidas a superfície do eletrodo foi renovada pelo simples polimento em papel.

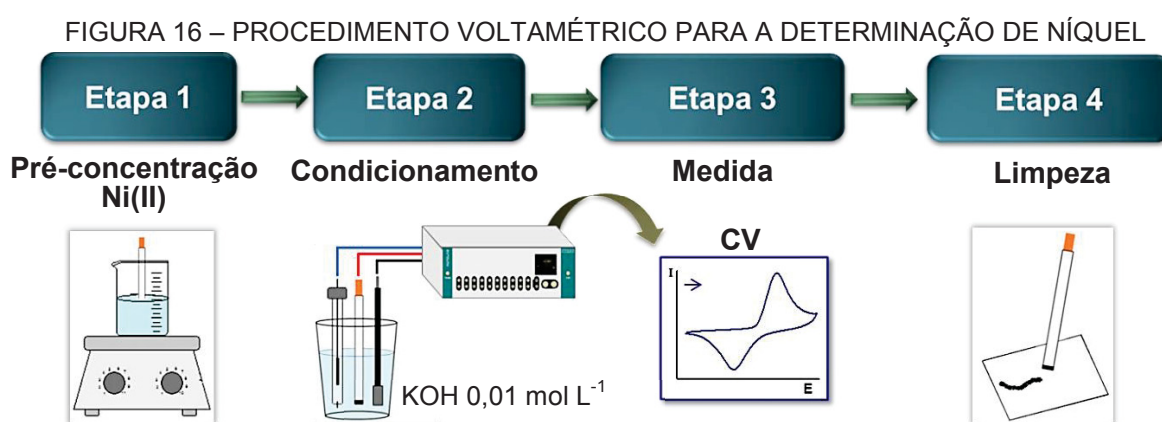
FIGURA 15 – PROCEDIMENTOS VOLTAMÉTRICOS ADOTADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS, PARA COMPOSTOS INORGÂNICOS (A) E ORGÂNICOS (B)



FONTE: O autor (2015).

3.3 DETERMINAÇÃO DE ÍONS NÍQUEL (II)

A avaliação voltamétrica para determinação de íons Ni(II) foi realizada utilizando uma célula convencional composta por um eletrodo de referência de Ag/AgCl em KCl 3,0 mol L⁻¹, um eletrodo de platina como contra-eletrodo e os eletrodos de pasta de carbono com e sem modificação como eletrodos de trabalho. O procedimento experimental foi realizado em três etapas, conforme apresentado na FIGURA 16, sendo estas descritas a seguir.



FONTE: O autor (2016).

- **Etapa 1:** A pré-concentração espontânea de íons Ni(II) na superfície do eletrodo foi realizada em solução de acetato de sódio com o pH ajustado em 7,0 contendo $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de nitrato de níquel. O eletrodo permaneceu em solução em condições de circuito aberto (sem a aplicação de potencial), durante 10 minutos e sob agitação constante.

- **Etapa 2:** O eletrodo contendo íons Ni(II) foi transferido para a célula eletroquímica contendo solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,01 mol L⁻¹. A etapa de condicionamento foi realizada com aplicação de potencial de 0,7 V durante 90 s.

- **Etapa 3:** Em seguida, foram realizadas medidas de voltametria cíclica aplicando uma varredura de potencial de 0,2 a 0,8 V, e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. As intensidades de corrente referentes aos sinais de oxirredução do par Ni(II)/Ni(III) foram amostradas após cinco ciclos.

- **Etapa 4:** Por fim, o eletrodo foi submetido a uma etapa de limpeza física pela simples renovação da superfície, realizada por polimento em papel.

3.3.1 Otimização dos Parâmetros Instrumentais para a Determinação de Níquel

Para o desenvolvimento da metodologia proposta foram realizados estudos com a finalidade de avaliar os parâmetros analíticos relacionados à preparação do eletrodo modificado, tal como composição da pasta modificada com biochar ativado, solução de pré-concentração de íons Ni(II), solução de leitura (eletrólito suporte) e parâmetros inerentes ao método instrumental. Com relação a estes parâmetros instrumentais, foram avaliados o potencial e o tempo de condicionamento (etapa prévia à varredura de potencial), velocidade de varredura e número de ciclos.

Para a otimização destes parâmetros foram consideradas como resposta ótima as medidas que apresentassem maior magnitude de corrente pico anódica. A seguir na TABELA 3 são apresentados os parâmetros analíticos que foram avaliados para a determinação de níquel.

TABELA 3 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL

| Parâmetro | Condições avaliadas |
|--|---|
| pH da solução de pré-concentração (acetato de sódio 0,01 mol L ⁻¹) | 6,0 – 9,0 |
| Tempo de pré-concentração de íons Ni(II) | 0,5 – 40 min |
| Proporção de biochar na pasta de carbono | 0,0 – 30 % (m/m) |
| Potencial de condicionamento | 0,20 – 0,80 V |
| Tempo de condicionamento | 0,0 – 150 s |
| Concentração do eletrólito suporte | 1,0 x 10 ⁻² – 5,0 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ |
| Velocidade de varredura | 10 – 100 mV s ⁻¹ |

3.3.2 Desempenho Analítico do EPCM-N2

Após a otimização de todas as condições experimentais, o método foi aplicado na determinação de íons Ni(II) em diferentes valores de concentração para a construção da curva analítica. A faixa de concentração de íons Ni(II) avaliada foi de 1,0 a 100 µmol L⁻¹. As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata para cada concentração, em solução de KOH 0,01 mol L⁻¹.

Posteriormente, com base na curva analítica, foi possível a obtenção das figuras de mérito referentes ao método proposto.

3.3.3 Influência de Espécies Concomitantes na Determinação de Níquel

A avaliação da possível interferência no sinal analítico do níquel, quando na presença de outras espécies concomitantes, foi realizada mediante a pré-concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de níquel na ausência e na presença de diferentes espécies: íons Pb(II), Cd(II), Cu(II), Fe(III) e Zn(II). As espécies foram adicionadas separadamente à solução de pré-concentração em três níveis de concentração: 1,0; 10 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para as avaliações voltamétricas deste estudo foram realizadas medidas ($n=3$) para cada espécie interferente.

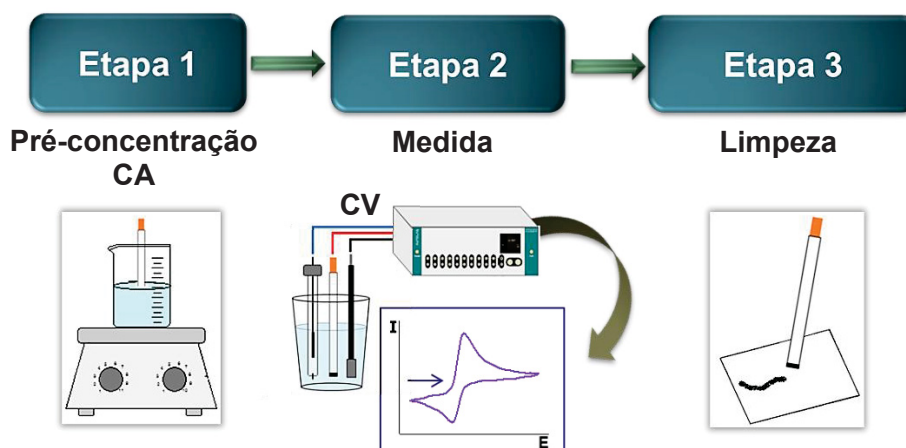
3.3.4 Determinação de Ni(II) em Amostras Fortificadas

O método proposto foi aplicado na determinação de níquel em amostras fortificadas de água de descarte e bioetanol combustível. A amostra de bioetanol foi submetida a uma etapa de diluição simples na razão de 1:10 (bioetanol : acetato de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0). A solução resultante foi enriquecida com solução padrão de níquel(II), obtendo-se uma solução com concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. A amostra de água de descarte não necessitou de nenhum tratamento prévio, e foi fortificada de acordo com o teor máximo de níquel ($34 \mu\text{mol L}^{-1}$) estipulado pela Resolução do CONAMA 430/2011 [173]. Em seguida, a amostra foi diluída numa proporção de 1:1 (água:acetato de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0). As determinações foram realizadas pelo método de adição de padrão de níquel.

3.4 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO

A avaliação da potencialidade analítica do EPCM com biochar ativado (EPCM-N2) para a determinação de ácido cafeico foi realizada explorando a capacidade de sorção e/ou interação do biochar com o composto orgânico avaliado. O procedimento voltamétrico foi realizado em três etapas, conforme mostrado na FIGURA 17 e descrito em seguida.

FIGURA 17 – PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO ÁCIDO CAFEICO



FONTE: O autor (2016).

- **Etapa 1:** A etapa de pré-concentração de ácido cafeico (CA) sobre a superfície do eletrodos foi realizada em uma solução de tampão fosfato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado em 4,0 e contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CA. O eletrodo permaneceu em solução em condições de circuito aberto (sem a aplicação de potencial), durante 5 minutos e sob agitação constante.

- **Etapa 2:** Após a etapa 1, o eletrodo foi gentilmente lavado em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado em 4,0 e transferido para a célula eletroquímica contendo solução de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado em 5,0. Aplicou-se a técnica de voltametria cíclica com varredura de potencial de 0,0 a 0,8 V, e velocidade de varredura de 75 mV s^{-1} . Com isso, foram obtidos os voltamogramas correspondentes a oxirredução do ácido cafeico.

- **Etapa 3:** Etapa de limpeza superficial do EPCM-N2, em que o eletrodo foi submetido a uma etapa de polimento e, conseqüentemente, renovação da superfície em papel.

3.4.1 Otimização dos Parâmetros Instrumentais para a Determinação de Ácido Cafeico

A influência das condições experimentais na resposta voltamétrica do ácido cafeico foi investigada em relação às soluções de pré-concentração e de medida, utilizando tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, onde foi avaliada a influência do pH das soluções. A quantidade de modificador (biochar) na pasta de carbono e o tempo de pré-concentração também podem influenciar na capacidade de sorção do analito e foram estudadas. E por fim, foi avaliada a velocidade de varredura do potencial, empregando voltametria cíclica. A escolha da melhor condição foi realizada em função da magnitude e definição dos sinais de resposta para o ácido cafeico. Os parâmetros experimentais e as condições avaliadas são apresentados na TABELA 4.

TABELA 4 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO

| Parâmetro | Condições avaliadas |
|---|-------------------------------|
| pH das soluções de pré-concentração e de medida | 2,0 – 6,0 |
| Proporção de biochar na pasta de carbono | 0,0 – 30 % (m/m) |
| Tempo de pré-concentração de CA | 1,0 – 20 min |
| Velocidade de varredura (voltametria cíclica) | 5,0 – 100 mV s^{-1} |

3.4.2 Desempenho Analítico do EPCM-N2

Após a otimização dos parâmetros experimentais, foi verificado o desempenho analítico do EPCM-N2 para a determinação de ácido cafeico mediante a realização da curva analítica. Para isso, medidas voltamétricas foram realizadas a partir de concentrações crescentes de ácido cafeico, de $1,0 \times 10^{-6}$ a $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Com base na curva de correlação entre intensidade de pico e concentração de ácido cafeico foi possível obter os parâmetros de mérito do método analítico.

3.4.3 Influência de Espécies Concomitantes na Determinação de Ácido Cafeico

Para avaliar se há interferência da resposta analítica do ácido cafeico quando na presença de outras espécies concomitantemente, foram feitas medidas na ausência e na presença destas espécies potencialmente interferentes. Foram selecionadas as seguintes substâncias: ácido ascórbico, ácido clorogênico, ácido gálico, catequina, quercetina e resveratrol. Estas espécies foram avaliadas em três níveis de concentração (mínima, média e máxima) tipicamente encontradas em amostras de vinho [240, 241], conforme apresentado na TABELA 5. O estudo foi realizado por comparação dos sinais de resposta obtidos para o ácido cafeico na concentração média encontrada de $1,11 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (20 mg L^{-1}), na ausência e na presença dessas espécies (individualmente e combinadas em uma solução multicomponente).

TABELA 5 – CONCENTRAÇÕES (MÍNIMA, MÉDIA E MÁXIMA) DE ÁCIDO CAFEICO E OUTRAS ESPÉCIES COMUMENTE ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE VINHO

| Espécie | Concentração (mol L^{-1}) | | |
|-------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Mínima | Média | Máxima |
| Ácido Cafeico | - | $1,11 \times 10^{-4}$ | - |
| Ácido Ascórbico | $1,70 \times 10^{-4}$ | $2,84 \times 10^{-4}$ | $3,97 \times 10^{-4}$ |
| Catequina | $3,44 \times 10^{-6}$ | $5,16 \times 10^{-4}$ | $1,03 \times 10^{-3}$ |
| Ácido Clorogênico | $2,82 \times 10^{-6}$ | $5,64 \times 10^{-6}$ | $1,12 \times 10^{-5}$ |
| Ácido Gálico | $5,88 \times 10^{-6}$ | $1,47 \times 10^{-3}$ | $2,94 \times 10^{-3}$ |
| Quercetina | $3,30 \times 10^{-6}$ | $8,27 \times 10^{-5}$ | $1,65 \times 10^{-4}$ |
| Resveratrol | $4,38 \times 10^{-6}$ | $8,75 \times 10^{-5}$ | $1,75 \times 10^{-4}$ |

FONTE: Adaptado de Escarpa e colaboradores [241]; Arribas e colaboradores [240].

3.4.4 Determinação de Ácido Cafeico em Amostras de Vinho

A determinação de ácido cafeico foi realizada em amostras reais de três tipos de vinho: branco (*Uvas Americanas*), rosé (*Syrah Cabernet*) e tinto (*Cabernet Sauvignon*). A amostra de vinho tinto foi diluída em uma proporção de 1:10 com solução de pré-concentração ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato pH 4,0). As amostras de vinho branco e rosé não exigiram nenhuma etapa de diluição. A

determinação foi realizada utilizando amostras reais e fortificadas com solução padrão de ácido cafeico em concentrações de 5,0; 10 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

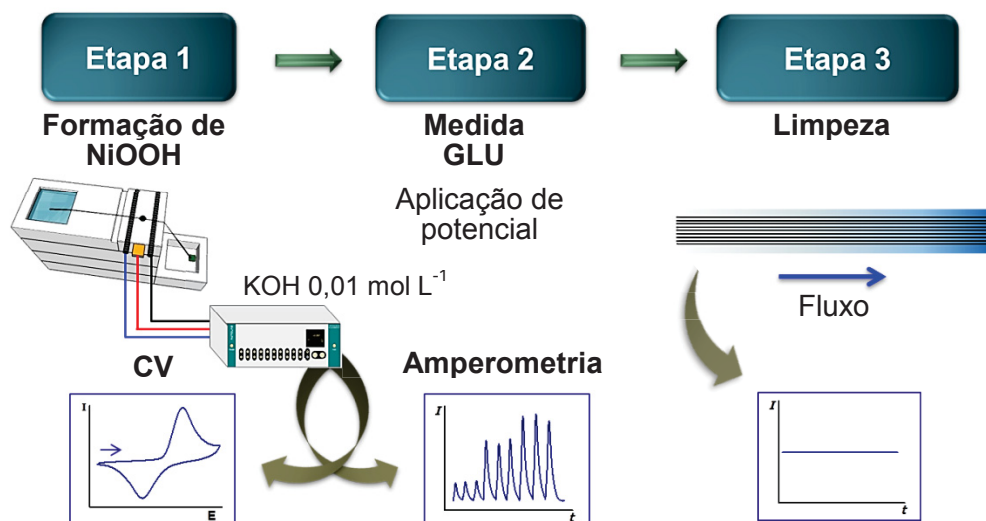
Também foi utilizado um método de determinação comparativo por Folin-Ciocalteu. Inicialmente, foi feita a calibração deste método por medidas espectrofotométricas na região do visível, nas concentrações de 0,0 a 500 mg L^{-1} de ácido cafeico. Para cada concentração analisada, uma alíquota de 20 μL destas soluções foi adicionada a 1,58 mL de água e 100 μL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após o tempo de incubação de 10 min, foram adicionados 300 μL de solução de carbonato de sódio e a mistura permaneceu em temperatura ambiente durante 2 horas. Em seguida, medidas espectrofotométricas foram realizadas a 750 nm [242]. Por fim, foram realizadas as medidas para as amostras de vinho, empregando o mesmo procedimento descrito acima.

3.5 DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE

Para esta etapa foi utilizado um sistema microfluídico baseado em fios têxteis (μTED), contendo um EPCM com oxi-hidróxido de níquel suportado em biochar ativado (EPCM-N₂Ni). Para a obtenção do eletrodo de trabalho, primeiramente, foi realizada a pré-concentração espontânea (circuito aberto) de íons Ni(II) na superfície do eletrodo. O eletrodo foi imerso em uma solução de acetato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 na presença de 5,0 mmol L^{-1} de nitrato de níquel(II), durante 5 segundos. Em seguida, o eletrodo foi lavado para remover o excesso de íons Ni(II) não adsorvidos pelo biochar, e foi acoplado ao dispositivo μTED .

A avaliação voltamétrica para determinação de glicose foi realizada empregando três etapas, conforme mostrado na FIGURA 18, que foram relatadas em seguida.

FIGURA 18 – PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE



FONTE: O autor (2017).

- **Etapa 1:** Formação do NiOOH realizada pela medida de voltametria cíclica utilizando KOH 0,01 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. As medidas foram realizadas na região de potencial de 0,2 a 0,7 V, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, durante 50 ciclos.
- **Etapa 2:** Determinação amperométrica de glicose empregando o EPCM-N2Ni, com aplicação de potencial fixo em meio de KOH 0,01 mol L⁻¹ como solução transportadora. Alíquotas de solução padrão de glicose foram injetadas diretamente no canal microfluídico, na zona de adição, na faixa de concentração 0,5 a 5,0 mmol L⁻¹ de glicose.
- **Etapa 3:** A limpeza do canal microfluídico ocorreu pela passagem de eletrólito suporte pelos canais, para a remoção do analito remanescente.

3.5.1 Otimização dos Parâmetros Instrumentais para a Determinação Não-enzimática de Glicose

Esta estratégia compreendeu à utilização do NiOOH como um mediador redox para catalisar a reação de oxidação da glicose, explorando a capacidade do biochar em pré-concentrar íons Ni(II) de maneira espontânea. Desta forma, houve a necessidade de avaliar a proporção mássica de biochar na pasta de carbono, e a melhor condição para a formação do NiOOH, sendo estudados o tempo de pré-

concentração de íons Ni(II) e o número de ciclos. Também foram avaliados parâmetros relacionados às medidas amperométricas utilizando o sistema microfluídico, tais como o potencial elétrico aplicado, o eletrólito suporte, o volume de adição de glicose e a vazão do dispositivo μ TED. A verificação da influência dos parâmetros experimentais e escolha do melhor resultado foram determinadas em função das sensibilidades das curvas analíticas, obtidas para cada condição avaliada, na presença de glicose, conforme apresentado na TABELA 6.

TABELA 6 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE

| Parâmetro | Condições avaliadas |
|---|------------------------------|
| Número de ciclos para formação do NiOOH | 0 (ausência) – 50 ciclos |
| Composição de biochar na pasta de carbono | 0,0 – 30 % (m/m) |
| Concentração de KOH (eletrólito suporte) | 20 – 80 mmol L ⁻¹ |
| Potencial aplicado (amperometria) | 0,50 – 0,75 V |
| Volume de injeção | 0,5 – 3,0 μ L |

A vazão do dispositivo μ TED é um parâmetro importante e que está diretamente relacionado à frequência analítica do dispositivo. O estudo para a determinação da vazão do dispositivo foi realizado pela pesagem do reservatório de saída em uma balança analítica Mettler Toledo AL204 (Columbus, EUA). Para isso, o dispositivo foi elevado e fixado sob o prato da balança, de modo que apenas o reservatório de saída estivesse em contato com o prato da balança. Assim, o reservatório de entrada foi preenchido com água deionizada, sendo esta transportada até o reservatório de saída, onde foi realizado o monitoramento de massa em função do tempo. A seguir, os valores de massa foram convertidos em volume considerando a densidade da água a 25 °C (0,997 g mL⁻¹).

3.5.2 Desempenho Analítico do EPCM-N2Ni acoplado ao μ TED

Com o intuito de verificar o desempenho analítico do método proposto, foram obtidas curvas analíticas por amperometria, empregando os parâmetros experimentais otimizados previamente. As adições das soluções de padrão de glicose ($n=3$) foram realizadas na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, no sentido crescente e decrescente de concentração. Com isso, foi construída a curva analítica, e os parâmetros de mérito para o referido método.

3.5.3 Influência de Espécies Concomitantes na Determinação de Glicose

A fim de avaliar a influência de espécies concomitantes na resposta amperométrica da glicose, foram selecionadas substâncias em concentrações tipicamente encontradas em amostras biológicas [243, 244], sendo estas: 0,13 mmol L⁻¹ de ácido ascórbico (AA), 22 mmol L⁻¹ de ácido láctico (LA) e 10 mmol L⁻¹ de ureia (UR). O efeito das espécies concomitantes foi avaliado isoladamente e também em uma solução multicomponente (Multi), em comparação ao sinal obtido pela injeção de glicose em concentração de 1,0 mmol L⁻¹.

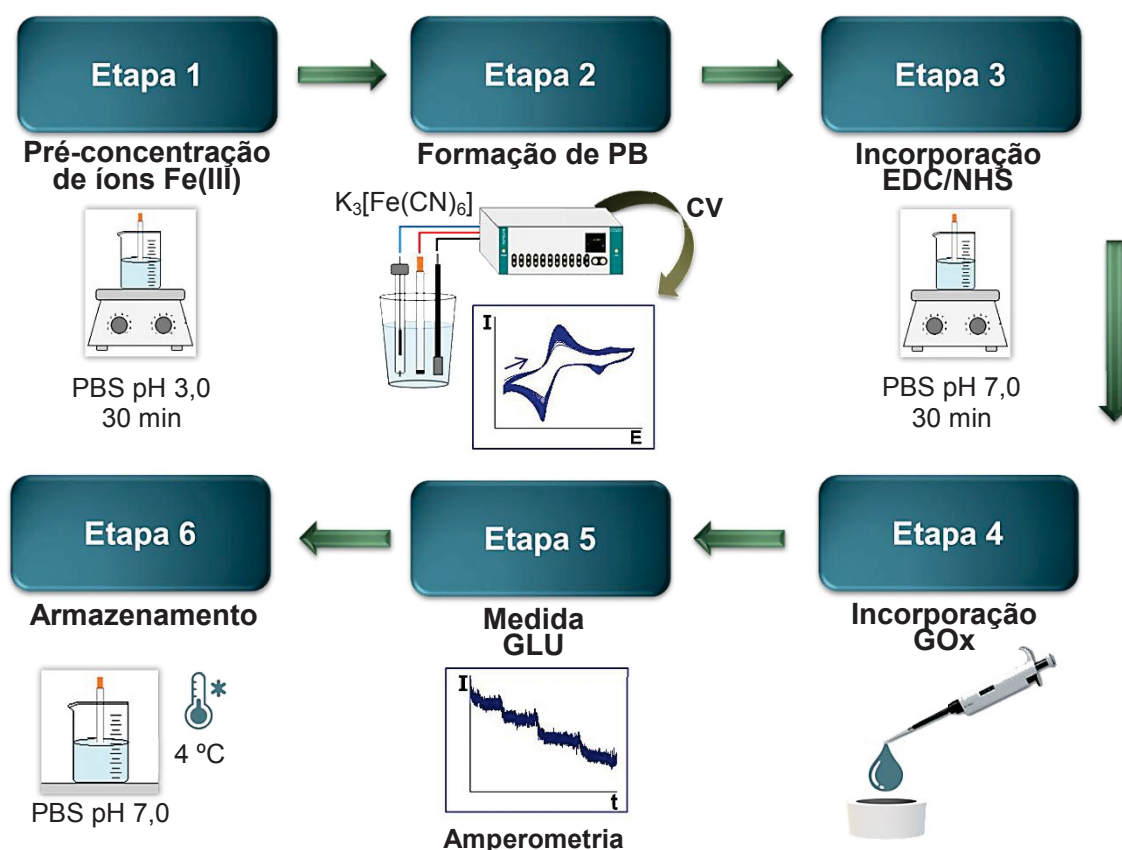
3.5.4 Determinação Não-enzimática de Glicose em Amostras de Soro e Saliva

A determinação de glicose foi realizada em amostras reais de saliva e soro sanguíneo humano. As amostras foram coletadas de voluntários saudáveis, sem histórico médico de alterações glicêmicas. As amostras foram diluídas com eletrólito suporte (solução de KOH 0,03 mol L⁻¹), nas proporções de 1:3 para saliva e 1:10 para soro sanguíneo. As medidas amperométricas foram realizadas utilizando as amostras reais e também fortificadas com glicose, em dois níveis de concentração de 0,30 e 0,50 mmol L⁻¹. Os procedimentos de utilização de amostras biológicas foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa – CEP/UFPR, CAAE número 82693418.7.0000.0102.

3.6 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE

Para esta avaliação foram exploradas as propriedades sortivas do biochar para a pré-concentração de íons Fe(III) na superfície do eletrodo EPCM-N2, para posterior síntese do mediador redox Azul da Prússia (Hexacianoferrato de Ferro), e incorporação da enzima glicose oxidase (GOx) na determinação de glicose. A atratividade desta estratégia é dada pela dificuldade da determinação direta de glicose, tal como o elevado potencial necessário para promover a sua oxidação. O procedimento experimental detalhado para a realização das medidas é descrito em seis etapas e pode ser visualizado na FIGURA 19.

FIGURA 19 – PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE



FONTE: O autor (2018).

- **Etapa 1:** O EPCM-N2 foi primeiramente colocado em uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato salino (PBS – do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) preparado com KCl 0,1 mol L⁻¹ com pH ajustado em 3,0, contendo 2,5 mmol L⁻¹ de íons Fe(III), sob agitação constante, para a pré-concentração em condições de potencial de circuito aberto, durante 30 minutos.

- **Etapa 2:** O eletrodo contendo íons Fe(III) foi lavado e transferido para a solução de ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]) 2,5 mmol L⁻¹ preparada em PBS 0,1 mol L⁻¹ com pH ajustado em 3,0. Nesta etapa foi realizada a síntese eletroquímica do Azul da Prússia (PB), sendo o eletrodo submetido a varreduras sucessivas de potencial, por voltametria cíclica, durante 25 ciclos, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Faixa de varredura do potencial de -0,3 a 1,2 V.

- **Etapa 3:** A seguir foi realizado o tratamento da superfície do biochar pela incorporação de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e NHS (N-hidróxisuccinimida), que permite a incorporação das enzimas GOx. EDC e NHS foram preparados em concentração de 1,0 mmol L⁻¹ em solução de PBS 0,10 mol L⁻¹ com pH ajustado em 7,0. O eletrodo foi mantido nesta solução, sob agitação constante, durante 30 minutos.

- **Etapa 4:** Para a imobilização da enzima, uma solução de GOx 10 un foi preparada com PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 7,0. Uma alíquota de 8,0 µL desta solução foi adicionada à superfície do eletrodo por “*drop-casting*”, e permaneceu durante 30 min para promover a sua imobilização.

- **Etapa 5:** O eletrodo EPCM-N2-PB- GOx foi lavado com água deionizada e medidas amperométricas foram realizadas em PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 7,0, com aplicação de potencial de -0,1 V (vs Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹). Adições de glicose foram feitas para a obtenção de curvas analíticas, na faixa de concentração 1,0 a 4,0 mmol L⁻¹ de glicose.

- **Etapa 6:** Após cada medida diária, o eletrodo foi armazenado em solução de PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 7,0, em temperatura de 4,0 °C.

3.6.1 Otimização dos Parâmetros Experimentais para a Determinação Enzimática de Glicose

Inicialmente, foi avaliado o número de ciclos necessários para a síntese eletroquímica do PB. Com relação as medidas amperométrica para a determinação de glicose, foi estudado o potencial aplicado durante estas medidas. A imobilização da enzima GOx é de suma importância para garantir a estabilidade do biossensor, assim, foi investigada a melhor forma de imobilização da enzima em função da quantidade de GOx e do seu tempo de imobilização na superfície do eletrodo. Por fim, foi avaliada a capacidade do biochar em pré-concentrar íons Fe(III). Estes parâmetros foram avaliados de acordo com as condições especificadas na TABELA 7.

TABELA 7 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE

| Parâmetro | Condições avaliadas |
|--|---------------------|
| pH de pré-concentração de íons Fe(III) | 2,0 – 6,0 |
| Número de ciclos para a formação do PB | 1,0 – 100 ciclos |
| Quantidade de enzima GOx imobilizada | 10 – 100 un |
| Tempo de incorporação da enzima GOx | 5,0 – 60 min |
| Potencial aplicado (amperometria) | -0,20 – 0,20 V |

3.6.2 Desempenho Analítico do Biossensor EPCM-N2-PB-GOx

A curva analítica por amperometria foi avaliada a partir de adições de glicose (n=3) na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Com isso, foram obtidos os parâmetros de mérito para o referido método. A partir da curva analítica também foi possível avaliar a afinidade enzima-substrato, pela constante cinética aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}), que fornece informações sobre a atividade catalítica e a afinidade existente entre a enzima GOx e a glicose. Para isso, utilizou-se a Equação (1), adaptada de Lineweaver-Burk.

$$\frac{1}{i_s} = \frac{1}{i_{\max}} + \frac{K_M^{app}}{i_{\max}} \times \frac{1}{C_{GLU}} \quad (1)$$

Onde, i_s corresponde à corrente no estado estacionário; i_{\max} à corrente máxima registrada pela saturação da glicose e C_{GLU} é a concentração de glicose [245, 246].

A estabilidade do biossensor EPCM-N2-PB-GOx foi avaliada em função de medidas amperométrica realizadas na presença de glicose em concentrações de 1,0 a 4,0 mmol L⁻¹. Eletrodos foram preparados em um mesmo dia e condicionados em solução de PBS pH 7,0 a 4 °C. Sendo que, ao longo dos dias, estes eletrodos foram avaliados, num total de 20 dias. A estabilidade foi determinada pela comparação entre as sensibilidades obtidas para os diferentes eletrodos (eletrodos com diferentes dias de preparo).

3.6.3 Influência de Espécies Concomitantes na Determinação Enzimática de Glicose

O estudo de espécies potencialmente concomitantes para esta estratégia seguiu o procedimento similar ao descrito na seção 6.1.3 para determinação não-enzimática de glicose. Foi avaliada a presença das seguintes espécies: 0,13 mmol L⁻¹ de ácido ascórbico (AA), 22 mmol L⁻¹ de ácido láctico (LA) e 10 mmol L⁻¹ de ureia (UR). A resposta obtida para 1,0 mmol L⁻¹ de glicose foi avaliada após a injeção das espécies isoladamente e em uma solução multicomponente (Multi).

3.6.4 Determinação Enzimática de Glicose em Amostras de Saliva e Soro Sanguíneo

A aplicação do método proposto foi também realizada de maneira semelhante ao procedimento descrito anteriormente para a determinação não-enzimática de glicose, utilizando amostras reais e fortificadas de soro sanguíneo e saliva. Neste caso, as amostras foram diluídas com solução de PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 7,0, nas mesmas proporções descritas, de 1:3 para saliva e 1:10 para soro sanguíneo.

3.7 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os estudos apresentados neste tópico foram realizados durante o período de estágio no exterior, pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE – CAPES). O estágio foi desenvolvido no “*Grup de Sensors i Biosensors*”, na Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha, supervisionado pelo Prof. Dr. Manel del Valle Zafra, com duração de 01 de Julho a 31 de Dezembro de 2017. Durante este período foram realizados estudos de pré-concentração e determinação simultânea dos compostos fenólicos catecol, 4-etilcatecol e 4-etilguaiacol, com a finalidade de utilizar um arranjo de eletrodos de pasta de carbono em uma língua eletrônica voltamétrica, visando a discriminação dos compostos empregando rede neural artificial (ANN – do inglês, *Artificial Neural Network*). O arranjo de sensores foi baseado em três eletrodos de pasta de carbono, sendo estes um eletrodo não modificado (EPC), e dois eletrodos modificados com nanotubos de carbono (EPCM-NTC) e com biochar ativado N2 (EPCM-N2).

3.7.1 Caracterização dos Sensores

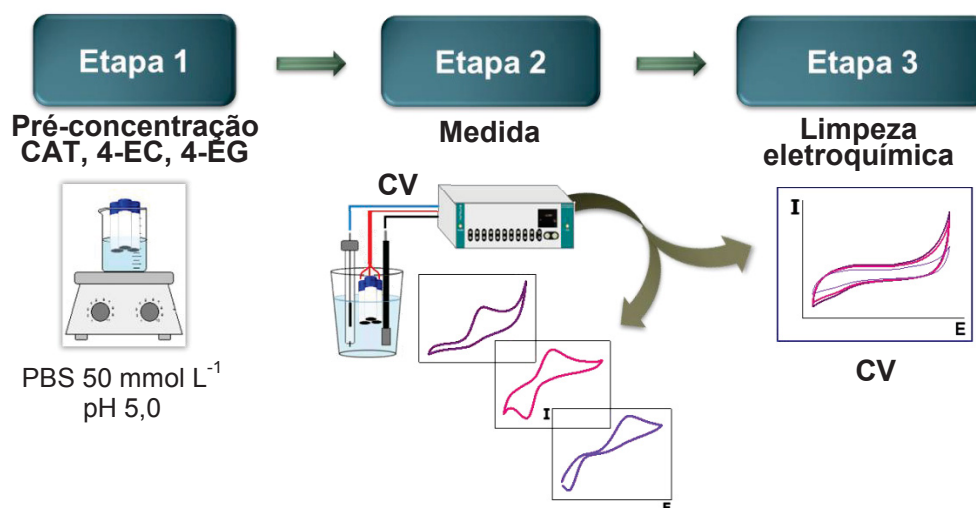
Os materiais carbonáceos (grafite, nanotubos de carbono e biochar ativado) e os eletrodos obtidos foram analisados morfologicamente por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A composição elementar semi-quantitativa dos materiais carbonáceos foi também realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS). As medidas foram realizadas conforme especificações descritas anteriormente na seção 3.1.2.

A caracterização voltamétrica dos eletrodos foi realizada por medidas de voltametria cíclica, na região de potencial entre -0,5 e 0,5 V com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} , em solução de PBS com pH ajustado em 4,5, na presença de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio e ferrocianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$). As medidas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Multi-canal Autolab Metrohm, com gerenciamento de dados pelo programa computacional GPES 4.9.

Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) também foram realizadas na presença de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, utilizando potencial de $0,17 \text{ V}$, frequência de 500 MHz a 50 mHz e amplitude de 10 mV . Os parâmetros elétricos dos sensores foram obtidos em função de um circuito equivalente de Randles. Tais medidas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Methrohm Autolab, gerenciado pelo programa computacional FRA.

O procedimento experimental para determinação de compostos fenólicos catecol, 4-etilcatecol e 4-etilguaiacol foi desenvolvido utilizando condições experimentais e instrumentais previamente otimizadas [221, 247], e seguindo as três etapas ilustradas na FIGURA 20 e descritas em seguida.

FIGURA 20 – PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS CATECOL, 4-ETILCATECOL E 4-ETILGUAIACOL



FONTE: O autor (2019).

- **Etapa 1:** A pré-concentração dos compostos fenólicos foi realizada em solução de 50 mmol L^{-1} de PBS com pH ajustado em 5,0. Em que, os eletrodos foram imersos na solução, sem aplicação de potencial, sob agitação constante, durante 5 minutos.

- **Etapa 2:** Os eletrodos foram gentilmente lavados para a remoção das espécies não adsorvidas e transferidos para a célula eletroquímica. Medidas de voltametria cíclica foram realizadas de $-0,3$ a $0,8 \text{ V}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Eletrólito suporte: 50 mmol L^{-1} de PBS pH 7,4.

- **Etapa 3:** Após cada medição, os eletrodos foram submetidos a uma etapa de limpeza eletroquímica por voltametria cíclica na mesma solução eletrolítica. Essas medidas foram realizadas na região de potencial entre -0,5 e 1,2 V, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , durante 10 ciclos.

3.7.2 Desempenho Analítico dos Sensores

Curvas analíticas foram obtidas por voltametria cíclica em concentrações crescentes de cada composto fenólico, individualmente para cada sensor proposto. As faixas de concentração avaliadas para cada analito foram as seguintes: 10 a 600 mmol L^{-1} para catecol; 0,1 a $400 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para 4-etilcatecol e 0,1 a $250 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para 4-etilguaiacol. Com isso, foi possível avaliar o desempenho analítico para cada sensor, e também obter as figuras de mérito para o método proposto.

3.7.3 Aplicação da Língua Eletrônica

O desempenho analítico dos três sensores aplicados na língua eletrônica foi avaliado pela quantificação simultânea dos três compostos fenólicos, em três níveis de concentração, de $5,0 \times 10^{-5}$, $7,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Para isso, foram utilizados dois subconjuntos de dados de treinamento (*training*) e de teste (*testing*). O subconjunto de treinamento foi utilizado para construir o modelo de resposta, e foi realizado com base em um planejamento fatorial 3^3 completo (3 fatores e 3 níveis), compondo 27 medidas. Já o subconjunto de teste foi composto por 10 amostras distribuídas aleatoriamente nos níveis de concentração avaliados e foi utilizado para auxiliar na predição do modelo de resultados. O planejamento empregado pode ser visualizado na TABELA 8.

TABELA 8 – PLANEJAMENTO FATORIAL 3³ APLICADO PARA AS MEDIDAS DO SUBCONJUNTO DE TREINAMENTO E CONCENTRAÇÕES DO SUBCONJUNTO DE TESTE

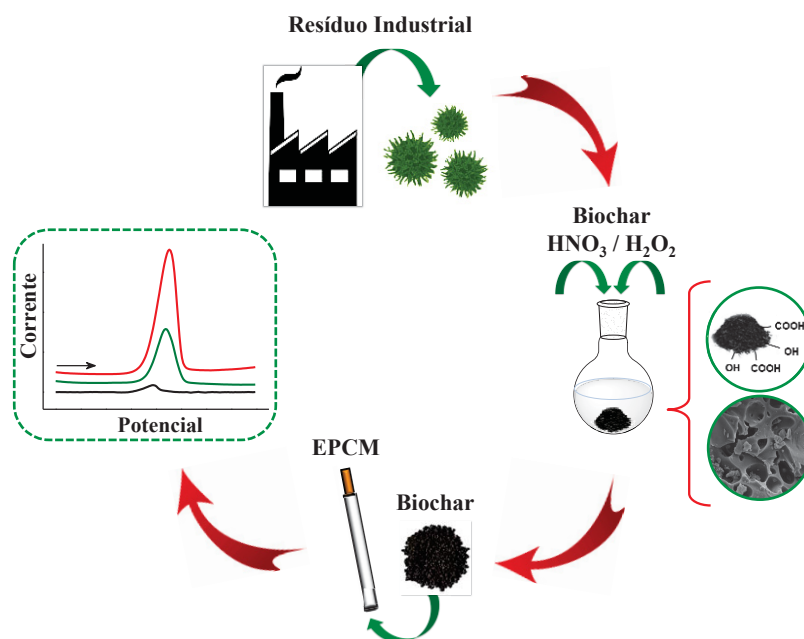
| Subconjunto | Medida | Concentração (mol L ⁻¹) | | |
|--------------------|--------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | CAT | 4-EC | 4-EG |
| Treinamento | 1 | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 2 | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 3 | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 4 | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 5 | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 6 | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 7 | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 5,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 8 | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 5,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 9 | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 5,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 10 | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 11 | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 12 | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 13 | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 14 | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 15 | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 16 | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 7,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 17 | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 7,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 18 | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 7,00 x 10 ⁻⁵ |
| | 19 | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ |
| | 20 | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ |
| | 21 | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ |
| | 22 | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ |
| | 23 | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ |
| | 24 | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ |
| | 25 | 5,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 1,00 x 10 ⁻⁴ |
| | 26 | 7,00 x 10 ⁻⁵ | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 1,00 x 10 ⁻⁴ |
| | 27 | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 1,00 x 10 ⁻⁴ | 1,00 x 10 ⁻⁴ |
| Teste | 1 | 7,17 x 10 ⁻⁵ | 9,39 x 10 ⁻⁵ | 5,75 x 10 ⁻⁵ |
| | 2 | 9,52 x 10 ⁻⁵ | 5,98 x 10 ⁻⁵ | 9,87 x 10 ⁻⁵ |
| | 3 | 7,83 x 10 ⁻⁵ | 8,03 x 10 ⁻⁵ | 8,08 x 10 ⁻⁵ |
| | 4 | 5,50 x 10 ⁻⁵ | 5,40 x 10 ⁻⁵ | 6,30 x 10 ⁻⁵ |
| | 5 | 8,82 x 10 ⁻⁵ | 9,79 x 10 ⁻⁵ | 9,57 x 10 ⁻⁵ |
| | 6 | 6,23 x 10 ⁻⁵ | 7,32 x 10 ⁻⁵ | 5,03 x 10 ⁻⁵ |
| | 7 | 9,81 x 10 ⁻⁵ | 6,45 x 10 ⁻⁵ | 7,59 x 10 ⁻⁵ |
| | 8 | 8,24 x 10 ⁻⁵ | 8,33 x 10 ⁻⁵ | 9,42 x 10 ⁻⁵ |
| | 9 | 6,47 x 10 ⁻⁵ | 5,20 x 10 ⁻⁵ | 5,45 x 10 ⁻⁵ |
| | 10 | 9,44 x 10 ⁻⁵ | 9,87 x 10 ⁻⁵ | 6,97 x 10 ⁻⁵ |

Devido à complexidade e elevada quantidade de dados gerados com a aplicação da ET, foi realizado um pré-processamento para normalização e compressão dos dados, utilizando a transformada DWT (Do inglês, *Discrete Wavelet Transform*), em quatro níveis de compressão. Esta etapa permitiu reduzir a complexidade dos dados, preservando as informações relevantes, melhorar o tempo de processamento dos dados, evitar a redundância nos dados de entrada, e obter um modelo com melhor capacidade de processamento. Para análise dos dados gerados após as 37 medidas, primeiramente, uma análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para a análise qualitativa das respostas voltamétricas. Para isso, medidas voltamétricas (n=3) para cada analito, empregando os sensores individualmente foram confrontadas pela aplicação de suas componentes principais.

Em seguida, foi feita a modelagem quantitativa dos dados, empregando Redes Neurais Artificiais (ANN). Este modelo possibilitou a redução dos erros entre os valores de saída esperados e os obtidos em cada interação. Foram utilizadas configurações específicas de 96 neurônios na camada de entrada (obtidos pelo método de compressão), 6 neurônios na camada oculta e 3 neurônios na camada de saída (correspondentes aos 3 compostos fenólicos avaliados). Os processamentos quimiométricos descritos acima foram realizados utilizando a programação do *software* MATLAB 7.1 (MathWorks, Natick, EUA), empregando suas ferramentas computacionais *Neural Networks* e *Wavelet*, para ANN e DWT, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOCHAR ATIVADO EM ELETRODOS



4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Análises de MEV foram realizadas para avaliar as características morfológicas das amostras de biochar. As FIGURAS 21 e 22 apresentam as imagens representativas obtidas para as amostras de biochar precursora (não tratada) e após os tratamentos de ativação.

FIGURA 21 – IMAGENS DE MEV OBTIDAS PARA A AMOSTRA DE BIOCHAR PRECURSOR COM AUMENTO DE 300 (A) E 2.000 VEZES (B), E PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR ATIVADO N1 (C) E N2 (D), COM AUMENTO DE 2.000 VEZES

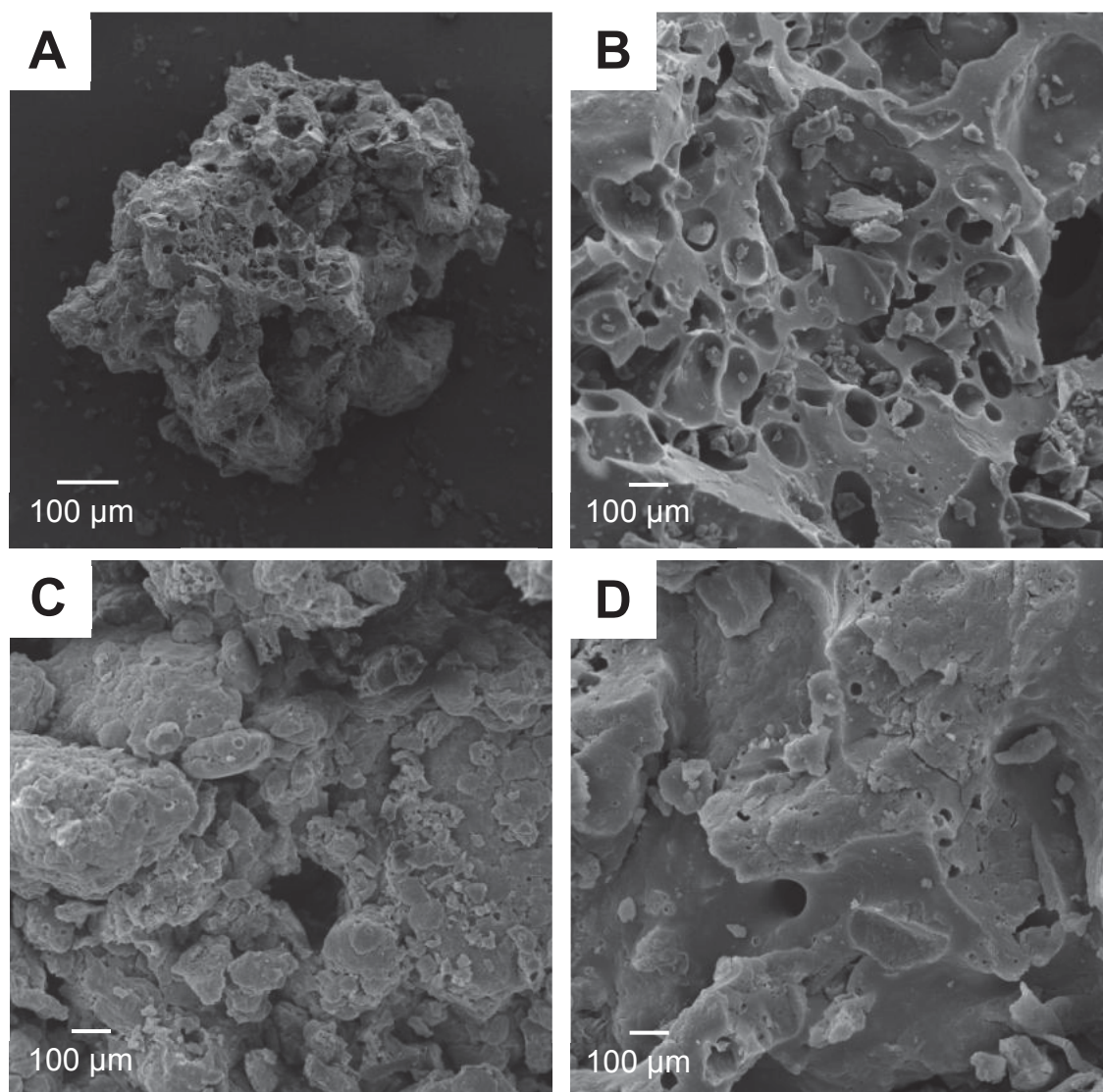
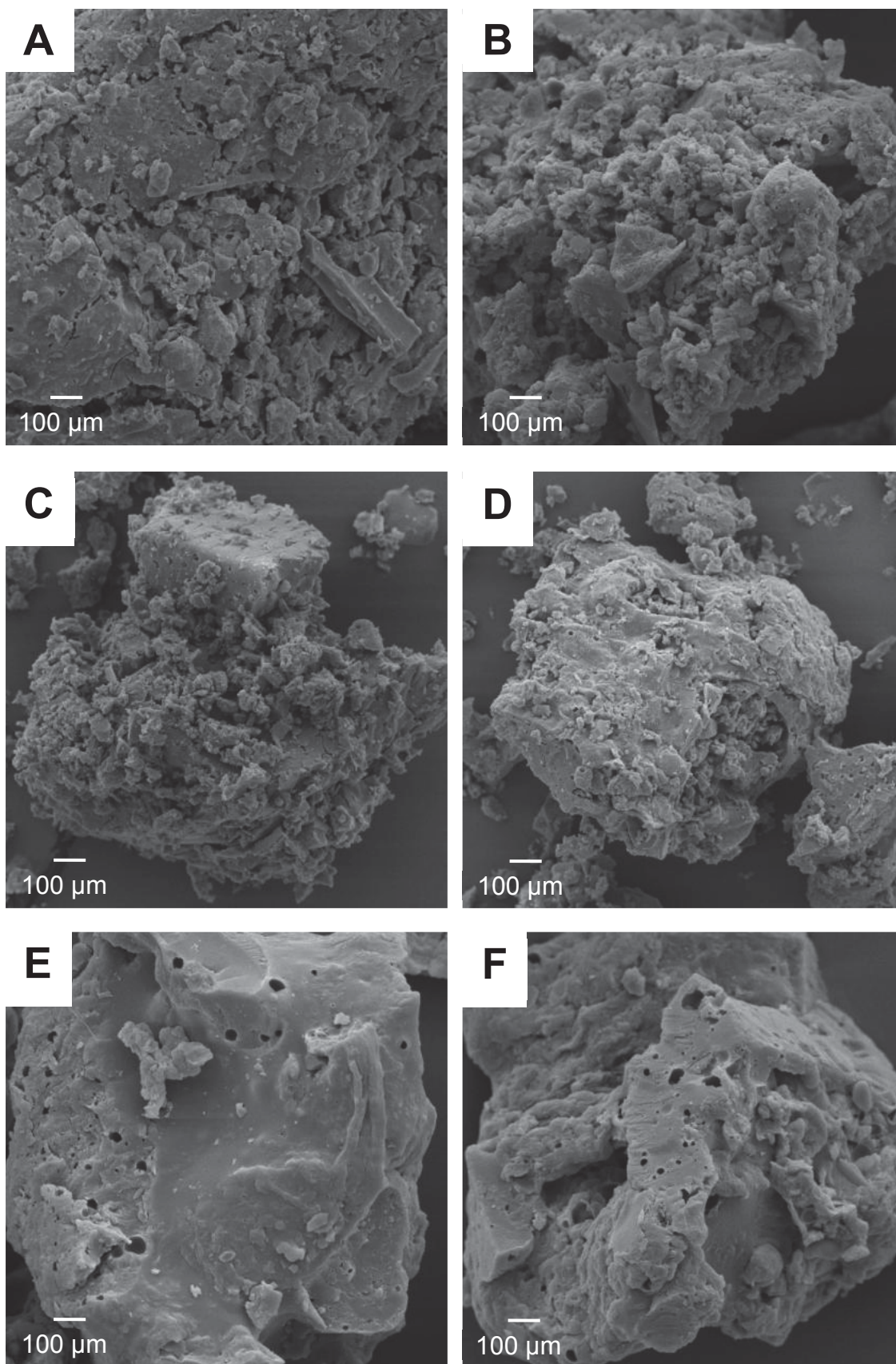


FIGURA 22 – IMAGENS DE MEV OBTIDAS PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR ATIVADO: N3 (A); N4 (B); N5 (C); NH (D); H1 (E) E H2 (F), COM AUMENTO DE 2.000 VEZES



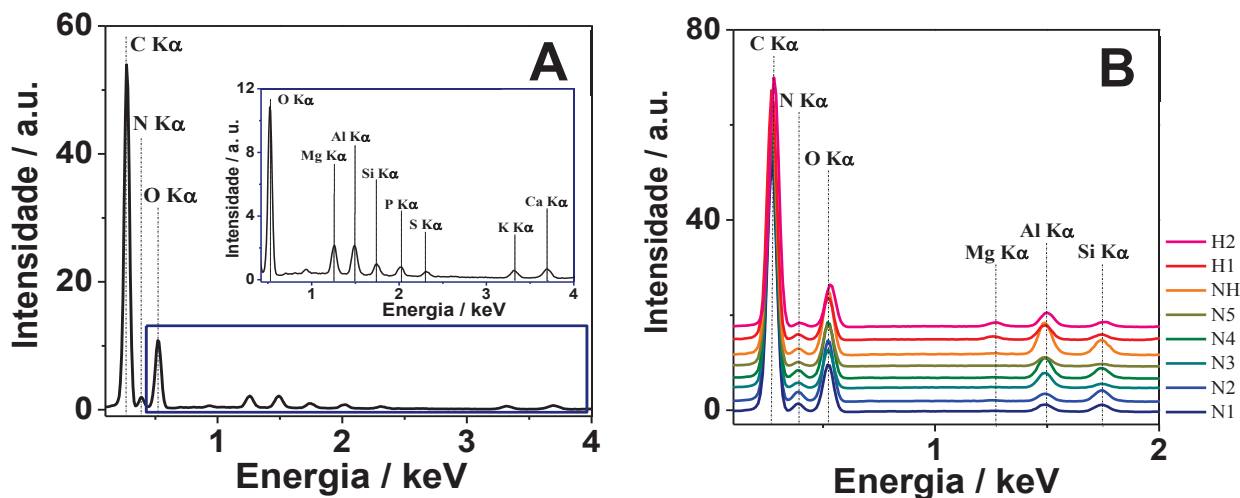
Com base nas imagens obtidas por MEV foi possível observar algumas variações morfológicas entre as amostras de biochar precursor e as ativadas quimicamente. Dentre estas, pode-se destacar que a amostra precursora apresentou uma estrutura com maior porosidade em comparação às demais. Isso sugere que os tratamentos de ativação promoveram a diminuição do tamanho dos poros, o que também pode ter alterado a sua área superficial. Com relação às amostras tratadas com ácido nítrico, foi observada uma maior variação estrutural. Isso pode ser explicado pois o HNO_3 é um agente altamente oxidante, e mais agressivo que o H_2O_2 , promovendo maior oxidação e alteração da superfície do biochar.

No entanto, para as amostras tratadas com H_2O_2 (FIGURAS 22-E, F), poucas alterações foram constatadas na superfície das partículas. Além disso, pode-se notar que a amostra NH (FIGURA 22-D), tratada com uma mistura de HNO_3 e H_2O_2 , também não exibiu diferenças morfológicas significativas, em comparação com amostras tratadas com HNO_3 . Em comparação, Stavropoulos e colaboradores [248] também avaliaram a influência da ativação com HNO_3 para a obtenção de carvão ativado, e constataram que o tratamento teve efeitos erosivos na estrutura do material. Outros autores também sugerem que esses efeitos poderiam estar relacionados à introdução de grupos funcionais nos poros da superfície de materiais carbonáceos, a partir da “destruição” das paredes dos poros [42, 47, 49].

4.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A seguir, foram realizadas análises de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), acoplado ao MEV, tendo como objetivo a estimativa elementar (semi-quantitativa) das amostras. Na FIGURA 23-A pode ser observado o espectro de EDS obtido para a amostra de biochar precursora, com aumento da região situada entre 0,4 e 4,0 keV, e na FIGURA 23-B os espectros obtidos para as amostras de biochar ativado quimicamente, em uma faixa mais restrita de energia, de 0,3 a 2,0 keV.

FIGURA 23 – ESPECTROGRAMAS DE EDS OBTIDOS PARA A AMOSTRA DE BIOCHAR PRECURSORA, COM AUMENTO DA REGIÃO ENTRE 0,4 E 4,0 KEV (A), E PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR ATIVADO (B)



O espectro de EDS da amostra de biochar precursora apresenta picos que denotam a existência de elementos característicos deste material. O processo de obtenção do biochar (pirólise) promove a queima incompleta da biomassa, com isso, alguns compostos podem ser formados e outros degradados [232]. Assim, tanto os compostos, quanto o seu teor resultante no biochar podem ser variáveis de acordo com a biomassa utilizada, e com as condições de pirólise [1]. Com base em um trabalho anterior, o material pirolisado apresentou teor significativo de carbono, e uma diminuição do teor de oxigênio, em comparação a biomassa de farelo de mamona [233]. Paralelo a isso, um aumento do teor de nitrogênio foi registrado, e pode ser explicado pela sua incorporação em estruturas do material que são resistentes ao calor e não voláteis [11, 249]. Compostos minerais, tais como magnésio, silício, fósforo, enxofre, potássio e cálcio, são também comumente encontrados no produto da pirólise, e são provenientes da matéria-prima utilizada [1].

Pelos espectros de EDS referentes às amostras de biochar ativado, foram observados somente picos referentes a carbono, oxigênio, magnésio, nitrogênio, alumínio e silício. Uma hipótese é que os outros minerais (fósforo, enxofre, potássio e cálcio), observados para a amostra precursora, podem ter sido removidos pela ação dos tratamentos químicos superficiais. Alguns autores sugerem que o HNO_3 pode promover a liberação de íons já existentes no biochar, ou seja, que os íons H^+ do ácido deslocam e/ou solubilizam cátions que estão presentes na superfície do biochar [48].

Com as análises realizadas por EDS também foi possível obter uma estimativa da composição elementar semi-quantitativa das amostras de biochar precursor (BC) e das amostras submetidas aos tratamentos de ativação química. Os resultados desta análise são apresentados na TABELA 9.

TABELA 9 – COMPOSIÇÃO ELEMENTAR SEMI-QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR OBTIDA POR ANÁLISES DE EDS

| Amostra | Composição Elementar (%) | | | | | | | | | |
|---------|--------------------------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | C | N | O | Mg | Al | Si | P | S | K | Ca |
| BC | 64,4 | 6,88 | 19,9 | 1,47 | 1,68 | 0,730 | 0,790 | 0,490 | 1,41 | 2,26 |
| N1 | 63,4 | 9,97 | 21,8 | 0,080 | 1,60 | 1,80 | - | 0,280 | - | - |
| N2 | 60,6 | 10,3 | 24,6 | 0,14 | 1,57 | 2,56 | - | 0,190 | - | - |
| N3 | 63,9 | 7,35 | 21,8 | 0,080 | 3,57 | 1,04 | - | 0,260 | - | - |
| N4 | 64,4 | 8,52 | 20,9 | 0,090 | 3,81 | 2,15 | - | 0,120 | - | - |
| N5 | 64,4 | 7,15 | 21,2 | 0,070 | 2,29 | 0,630 | - | 0,170 | - | - |
| H1 | 64,4 | 4,98 | 20,3 | 0,570 | 3,03 | 1,20 | 0,590 | 0,180 | 0,300 | 1,29 |
| H2 | 64,3 | 5,95 | 20,2 | 0,820 | 3,35 | 1,32 | 0,200 | 0,260 | 1,71 | 0,750 |
| NH | 62,2 | 7,27 | 22,5 | 0,110 | 5,78 | 3,09 | - | 0,060 | - | - |

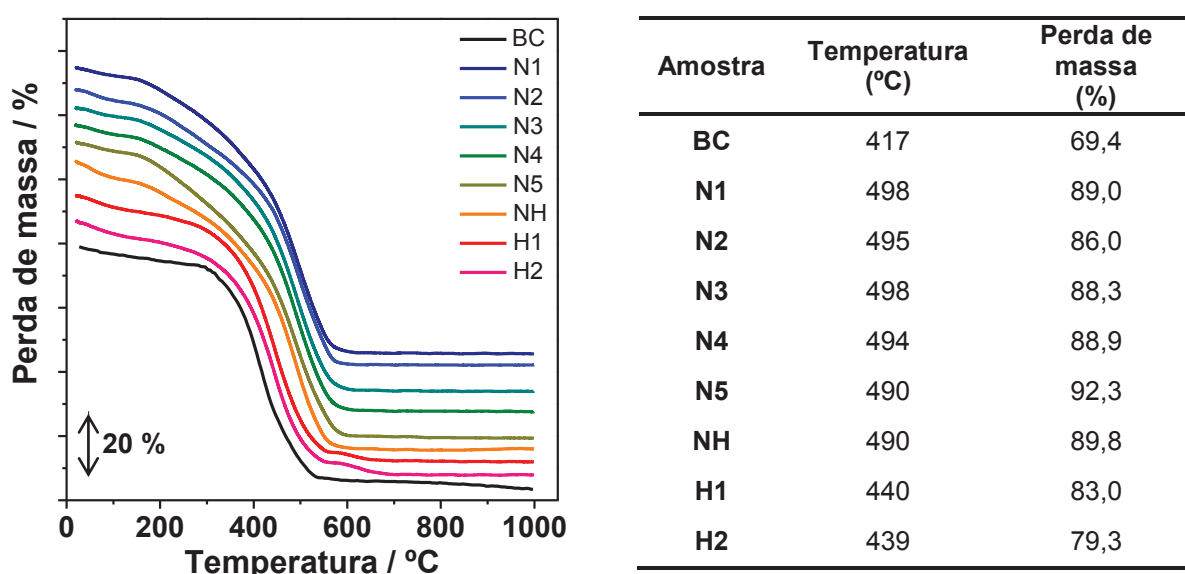
Analisando os dados obtidos, foi possível constatar variações da composição química do biochar após os tratamentos de ativação, compatíveis com outros relatos da literatura [42, 44]. Dentre estas, pode-se ressaltar o aumento a quantidade de oxigênio, observado para todas as amostras ativadas. Isso pode ser explicado pela oxidação da superfície do biochar, que leva à formação de grupamentos hidroxílicos e carboxílicos, aumentando os teores de oxigênio. Já o aumento do teor de nitrogênio foi observado para as amostras tratadas com HNO_3 , e pode ser relacionado à formação de grupos nitro, formados pela oxidação de grupos amínicos presentes nas amostras, ou à adsorção de íons nitrato na superfície dos materiais [248].

Destaca-se que a amostra N2 (tratada com HNO_3 , durante 3 horas em temperatura de 60 °C) apresentou as maiores variações de composição elementar. Para as amostras H1 e H2, tratadas com H_2O_2 , as mudanças de composição elementar foram pouco significativas, o que é concordante com relatos da literatura, e está atrelado ao fato de que este tratamento é menos agressivo em comparação ao tratamento com HNO_3 [47].

4.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

Para investigar o comportamento térmico do biochar antes e após os tratamentos de ativação, foram realizadas análises de TGA, até temperatura de 1000 °C. Os resultados obtidos, baseados nos processos térmicos observados com a perda de massa das respectivas amostras são apresentados na FIGURA 24.

FIGURA 24 – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS E PROCESSOS DE PERDA DE MASSA OBTIDOS POR TGA PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR



Os processos de perda de massa do biochar estão relacionados à degradação dos compostos celulósicos. A degradação da hemicelulose normalmente é observada em temperaturas em torno de 300 °C [250]. Além disso, a perda de água remanescente no material carbonáceo pode ser observada de 105 a 200 °C. Entre 200 e 300 °C também pode ocorrer a decomposição de hidroxilas e grupos carboxílicos [1]. E até 400 °C a decomposição de carboidratos e/ou compostos alifáticos é relatada [251]. No entanto, nenhum processo térmico foi observado até a temperatura de 400 °C, uma vez que tais compostos já podem ter sido degradados com a etapa de pirólise para a obtenção das amostras de biochar, realizada em 400 °C.

Outros processos térmicos comumente relatados para amostras de biochar estão relacionados à decomposição da celulose e também à degradação de compostos aromáticos, acima de 400 °C. Já a degradação da lignina ocorre lentamente até temperatura de 900 °C. E processos acima de 600 °C podem ser correlacionadas a estruturas recalcitrantes termicamente [250]. Para todas as amostras avaliadas foi observado o processo térmico relacionado à degradação da celulose. Para a amostra BC foi observada uma perda de massa de 69,4 % em temperatura de 417 °C. Após os tratamentos de ativação, as amostras apresentaram um maior percentual de perda de massa. Alguns autores sugerem que essas perdas de massa podem estar associadas, principalmente, à decomposição de grupos de ácidos carboxílicos (-COOH) e outros grupos oxigenados presentes nas amostras ativadas [252, 253]. Isso significa que os tratamentos químicos influenciam na decomposição do biochar. Além disso, um deslocamento nos processos térmicos para temperaturas mais elevadas foi observado para as amostras ativadas em comparação com a amostra BC.

As amostras tratadas com H₂O₂ apresentaram menor variação em relação ao processo térmico, registrado em 440 e 439 °C, com perdas de massa de 83 e 79 % para amostras H1 (tempo de refluxo de 1,0 h) e H2 (tempo de refluxo de 2,0 h), respectivamente. Em contrapartida, as amostras tratadas com HNO₃ apresentaram um maior deslocamento dos picos para este processo, registrado acima de 490 °C, e com perdas de massa que variaram entre 86 e 92 %. Inyang e colaboradores [254] também obtiveram materiais com maior estabilidade térmica após tratamentos de ativação de biochar de bagaço de cana-de-açúcar. Os autores registraram deslocamentos nos picos entre 350 e 500 °C, com perdas de massa de 70 a 80 %. Assim, os resultados obtidos podem indicar o aumento de estruturas mais difíceis de serem degradadas, ou seja, de materiais mais recalcitrantes após os tratamentos de ativação.

4.1.4 pH e Condutividade Elétrica

Os resultados obtidos pelas medições de pH e condutividade estão presentes na TABELA 10, onde foi observado que todas as amostras de biochar apresentaram um caráter ácido. A amostra de biochar precursor apresentou um pH de 6,0 e um decréscimo foi observado para as amostras após a ativação. Com o tratamento de ativação, os grupos funcionais carregados negativamente tendem a se formar no biochar superficial, causando a diminuição dos valores de pH. O HNO_3 é um oxidante mais reativo em comparação ao H_2O_2 , sendo assim, as amostras tratadas com HNO_3 apresentaram menor valor de pH. Destaca-se que a amostra de biochar N2, obtida por síntese com HNO_3 a $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 3,0 h, que registrou o menor valor de pH. Esta amostra também apresentou maior condutividade elétrica em comparação às demais amostras ativadas. Esse comportamento pode estar relacionado a maior quantidade de grupos funcionais presentes na superfície desta amostra.

TABELA 10 – VALORES DE PH E CONDUTIVIDADE ELÉTRICA OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR PRECURSOR E ATIVADAS (N=3)

| Amostra | pH | Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) |
|---------|-----------------|--|
| BC | 6,00 \pm 0,20 | 35,4 \pm 1,1 |
| N1 | 5,30 \pm 0,07 | 27,5 \pm 0,2 |
| N2 | 5,10 \pm 0,10 | 30,3 \pm 0,1 |
| N3 | 5,50 \pm 0,07 | 20,6 \pm 0,2 |
| N4 | 5,35 \pm 0,04 | 22,9 \pm 0,1 |
| N5 | 5,50 \pm 0,06 | 14,9 \pm 0,1 |
| NH | 5,30 \pm 0,10 | 18,8 \pm 0,3 |
| H1 | 5,56 \pm 0,04 | 10,2 \pm 0,1 |
| H2 | 5,63 \pm 0,02 | 13,9 \pm 0,1 |

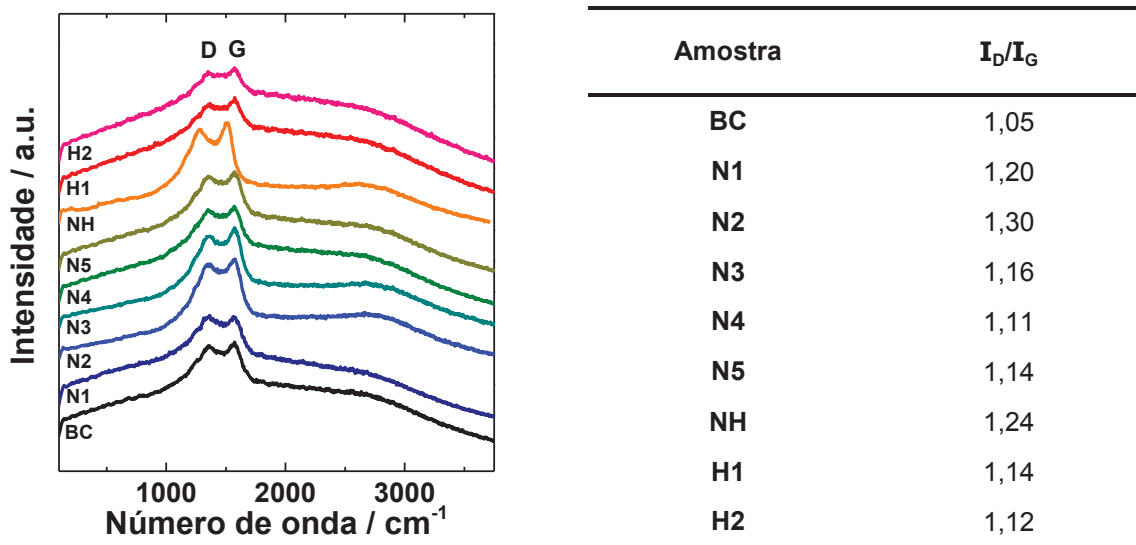
Em um trabalho semelhante, Estupiñan e colaboradores [47] relataram que amostras de biochar ativado produzido a partir de cascas de coco apresentaram um significativo aumento de acidez para amostras tratadas com HNO_3 , em comparação às amostras tratadas com H_2O_2 . Além disso, estas amostras apresentaram maior acidez do que o material precursor. Esses resultados foram correlacionados com o aumento dos grupos funcionais oxigenados, seguindo a ordem: $\text{HNO}_3 > \text{H}_2\text{O}_2 > \text{BC}$.

No presente trabalho, BC apresentou a maior condutividade elétrica, em comparação com todos os materiais ativados. Isso pode ser explicado pela sua maior quantidade de compostos minerais, como silicatos, carbonatos e fosfatos, conforme observado pelas análises de EDS. Para a amostra BC, a elevada condutividade pode afetar a eficiência da adsorção pela competição da substância de interesse com esses minerais adsorvidos superficialmente, como também foi relatado para outros autores [255, 256]. Por outro lado, as amostras submetidas aos tratamentos de ativação mostraram uma diminuição em relação à condutividade. Neste caso, as amostras tratadas com H_2O_2 apresentaram menores valores de condutividades, o que pode sugerir que estas apresentam menor quantidade de grupos funcionais. Já o comportamento contrário foi observado para as amostras tratadas com HNO_3 .

4.1.5 Espectroscopia Raman

O grau de desordem das amostras de biochar foi avaliado por análises de espectroscopia Raman, na região entre 100 e 3800 cm^{-1} , onde foi possível observar a presença das bandas D e G em 1350 e 1570 cm^{-1} , respectivamente. A banda G está associada ao estiramento de átomos de carbono com ligações sp^2 e fornece informações sobre o grau de grafitação da amostra. A banda D é formada por formas vibracionais que se tornam ativas quando há defeitos e funcionalizações, como a presença de grupos $-\text{OH}$ e $-\text{COOH}$, nos planos hexagonais dessas estruturas [257, 258]. Assim, as bandas D e G foram correlacionadas para obter a razão I_D/I_G entre as intensidades das bandas, representativas da quantidade de defeitos das amostras de biochar. Os resultados obtidos podem ser observados na FIGURA 25.

FIGURA 25 – ESPECTROS RAMAN E RAZÕES ENTRE AS BANDAS D E G (I_D/I_G) OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR PRECURSOR E ATIVADAS

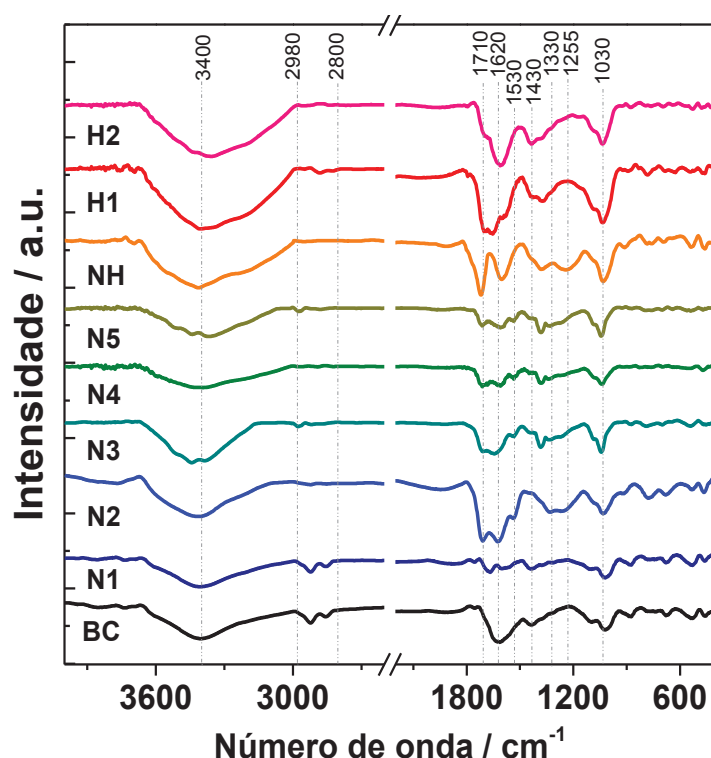


A amostra de biochar precursor (BC) apresentou razão I_D/I_G de 1,05. Para todas as amostras ativadas foi encontrado um aumento em relação a este valor, que pode ser correlacionado com o aumento dos grupos funcionais superficiais após a ativação química. No entanto, as amostras N3, N4 e N5 (tratamento com HNO_3), H1 e H2 (tratamento com H_2O_2) exibiram um aumento discreto, de 1,11 a 1,16. Já as amostras N1, N2 e NH apresentaram os maiores valores de I_D/I_G de 1,20; 1,30 e 1,24, respectivamente. Resultados semelhantes foram reportados por outros trabalhos da literatura. Inyang e colaboradores [254] obtiveram um aumento dessa razão de 1,11 para 1,30, após o tratamento de amostras de biochar com nanotubos de carbono a 1,0 % (m/m) (sob agitação, por 1,0 h). Jiang e colaboradores [259] também relataram um sutil aumento de 1,05 para 1,18 após a ativação de biochar de madeira de cedro, utilizando $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 (sob agitação em temperatura ambiente, por 12 h). Com isso, pode-se sugerir que os materiais ativados apresentaram uma maior proporção de grupos funcionais superficiais, ou defeitos, em comparação à amostra precursora.

4.1.6 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Com o objetivo de obter informações a respeito dos grupos funcionais presentes na superfície das amostras de biochar antes e após os tratamentos de ativação química, foram realizadas medidas de FTIR. Os espectros de FTIR obtidos são mostrados na FIGURA 26.

FIGURA 26 – ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR PRECURSOR E ATIVADAS



Os espectros de FTIR indicaram algumas modificações estruturais entre o biochar antes e após os tratamentos de ativação, com relação às distinções espectrais. Contudo, todas as amostras apresentaram bandas características do material carbonáceo. Dentre as bandas observadas, pode-se destacar a banda em torno de 3400 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação -OH . Vibrações entre 3000 e 2800 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento C-H , sendo que os espectros das amostras de biochar ativado apresentaram bandas com intensidade pouco significativa nesta região [260]. A banda em 1620 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C=C de anéis aromáticos ou a deformação C-H .

Estiramento C=C e ao modo de dobramento $-\text{CH}_2$, relacionado a carboidratos de lignina das amostras, podem ser caracterizados pela banda em 1430 cm^{-1} . A região entre 1400 e 1200 cm^{-1} pode ser associada à presença de diversos grupamentos, o que pode ocasionar em sobreposições de picos. Entretanto, em relação às amostras de biochar, podem-se atribuir estas bandas a grupos $-\text{OH}$ de fenóis e ácidos carboxílicos. A banda em 1030 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C–O e ao modo de dobramento O–H de fenóis e ácidos carboxílicos [261]. Bandas entre 1000 e 900 cm^{-1} podem ser associadas ao estiramento assimétrico C–O–C, característico de componentes celulósicos (celulose e lignina) ainda presentes nas amostras de biochar [262]. Por fim, ligações do tipo Si–O podem ser sugeridas pela presença da banda em 464 cm^{-1} [263].

Após os tratamentos de ativação, outros grupos funcionais foram gerados na superfície do biochar. De modo geral, as amostras ativadas apresentaram, dentre outras, bandas em 1710 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O de grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$). Bandas de estiramento C–O e estiramento assimétrico C–O–H, ambos de $-\text{COOH}$, podem ser atribuídas na região em torno de 1250 cm^{-1} [264]. A formação de grupos funcionais após a ativação do biochar pode ocorrer na porção alifática da molécula, rompendo os carbonos benzílicos de ligações C–C ou por reações de oxidação envolvendo metileno ($-\text{CH}_2$) [265]. Além disso, a presença de grupos nitro nas amostras pode ser identificada pelas bandas em 1530 e 1330 cm^{-1} e associadas, respectivamente, aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo $-\text{NO}_2$. Isso sugere que a reação de nitração pode ocorrer simultaneamente com a reação de oxidação [261]. A introdução de grupos nitro superficialmente adsorvidos no biochar pode ocorrer a partir da dissociação do HNO_3 , gerando íons nitrônio que reagem com os anéis aromáticos da estrutura do biochar [266]. Além disso, este tratamento pode liberar íons de grupos existentes na superfície do biochar, ou seja, íons H^+ do HNO_3 podem deslocar e/ou solubilizar cátions que estão presentes no biochar. Isso permite que mais grupos funcionais presentes no material ativado estejam disponíveis para interagir com outros compostos [252].

4.1.7 Estimativa de Grupos Ácidos Superficiais

Após a identificação dos grupos funcionais presentes nas amostras de biochar, titulações realizadas pelo método de Boehm foram conduzidas para estimar a quantidade de grupos ácidos totais (carboxílicos, fenólicos e lactônicos), em equivalente por grama de biochar (mmol g^{-1}), presentes na superfície das amostras. Para isso, as amostras foram neutralizadas com NaOH, um excesso de HCl foi adicionado, e as titulações potenciométricas foram realizadas empregando NaOH como solução titulante. Assim, as quantidades de grupos ácidos totais foram obtidas por cálculos de retrotitulação (TABELA 11) em comparação às condições de tratamento de cada amostra de biochar ativado.

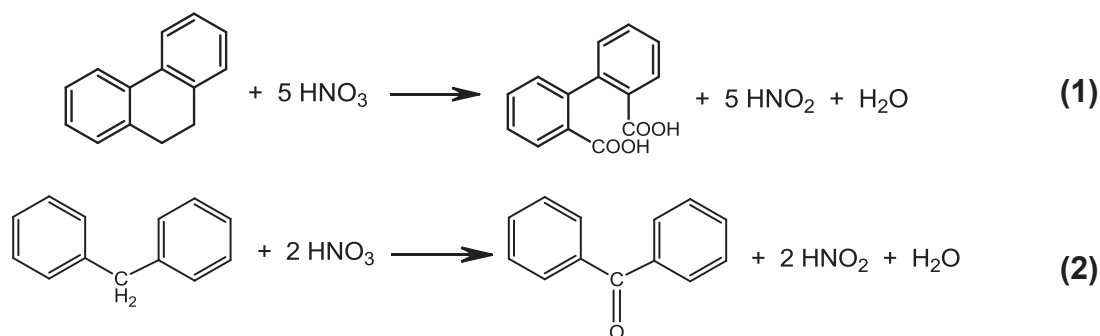
TABELA 11 – GRUPAMENTOS ÁCIDOS TOTAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE BIOCHAR

| Amostra | Condições de Tratamento | | | Grupos Ácidos Totais (mmol g^{-1}) |
|---------|--|-------|-----------------|--|
| BC | * | | | $4,98 \pm 0,29$ |
| N1 | HNO ₃ 50 % | 60 °C | 1,0 h | $6,57 \pm 0,12$ |
| N2 | | | 3,0 h | $7,87 \pm 0,16$ |
| N3 | | 90 °C | 1,0 h | $5,75 \pm 0,18$ |
| N4 | 3,0 h | | $5,97 \pm 0,07$ | |
| N5 | HNO ₃ 75 % | 60 | 1,0 h | $5,55 \pm 0,16$ |
| H1 | H ₂ O ₂ 35 % | 40 | 1,0 h | $5,31 \pm 0,07$ |
| H2 | | | 2,0 h | $5,27 \pm 0,18$ |
| NH | HNO ₃ + H ₂ O ₂ | 60 | 1,0 h | $7,30 \pm 0,05$ |

*Amostra de biochar precursora (não tratada)

Diante dos dados apresentados é possível fazer uma relação entre a quantidade de grupamentos ácidos superficiais totais gerados e as condições empregadas para a ativação química das amostras de biochar. Pode-se constatar que as amostras de biochar submetidas aos tratamentos de ativação/funcionalização superficial apresentaram um aumento de grupos funcionais ácidos, em relação a amostra BC, que apresentou o valor de aproximadamente $5,0 \text{ mmol g}^{-1}$.

Os tratamentos com HNO_3 permitiram ainda a formação de uma maior quantidade destes grupos em comparação aos tratamentos com H_2O_2 . Tais resultados são concordantes com outros trabalhos relatados [47, 48], em que as condições de tratamento com HNO_3 foram determinantes para a incorporação de grupos funcionais [267]. O ácido nítrico pode reagir com grupos funcionais básicos, tais como cetonas e pironas, para formar grupos funcionais ácidos a partir da abertura de heterociclos presentes na estrutura [268]. Esta reação permite que o íon nitrônio ($-\text{NO}^{2+}$) se ligue as estruturas aromáticas do biochar. Além disso, a formação de grupos ácidos também pode ocorrer na estrutura alifática do biochar, pela quebra de ligações C–C (Reação (1)). Reações de oxidação podem ocorrer com o grupo metileno ($-\text{CH}_2$), resultando na formação de grupos cetônicos por exemplo (Reação (2)) [265].

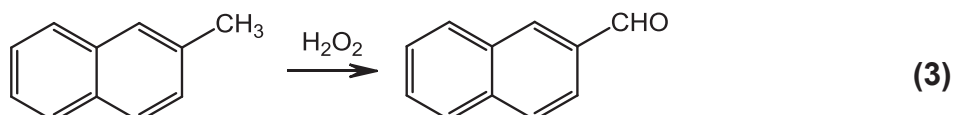


A formação de grupos funcionais permite que o material apresente mais sítios ativos para interagir com outros compostos, por diferentes mecanismos de interação superficial [37, 269]. Para estes tratamentos, observa-se ainda que em um tempo de refluxo superior (3,0 horas) ocorre a geração de uma maior quantidade de grupos ácidos. Isto é condizente, uma vez que com o maior tempo de contato com o ácido, maior a formação destes grupos.

Entretanto, para os métodos empregando temperatura mais elevada (90 °C) e concentração de HNO_3 de 75 % não foram observadas variações significativas de grupos ácidos totais. Isso pode sugerir que a temperatura não apresenta grandes influências nos tratamentos de funcionalização do biochar, conforme observado também em outros trabalhos da literatura [44]. Assim, não houve a necessidade do emprego de temperaturas de refluxo superiores a 60 °C, utilizando HNO_3 50 % como agente oxidante. Com base nestas informações,

destaca-se a amostra N2, obtida nesta condição e com tempo de refluxo de 3 horas, apresentou a maior quantidade de formação de grupos funcionais ácidos, em comparação às demais amostras avaliadas.

Já para os tratamentos empregando H_2O_2 , a formação de grupos funcionais pode ocorrer a partir de grupos metileno ($-CH_2-$), ligados ao anel aromático ou grupos cíclicos, conforme a Reação (3) [265].

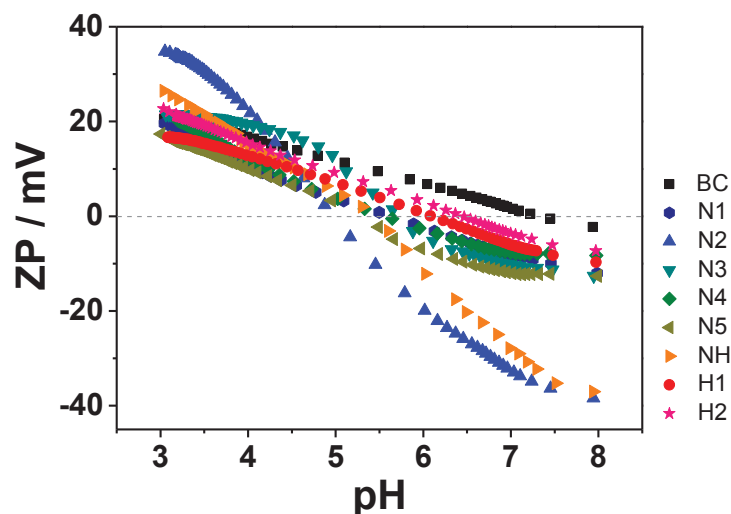


As titulações das amostras obtidas com este tratamento apresentaram variações pouco significativas para os tempos de 1,0 e 2,0 horas, sugerindo que com este agente oxidante o tempo de refluxo não influenciou na geração de grupamentos funcionais. Deste modo, pode-se supor que os grupos ácidos estimados para o tratamento misto ($HNO_3 + H_2O_2$) são majoritariamente decorrentes da utilização de HNO_3 . Estes resultados corroboram com as constatações de que os tratamentos de ativação realizados com HNO_3 apresentaram maior influência na formação de grupos funcionais ácidos no biochar.

4.1.8 Determinação do Potencial Zeta

Medidas de investigação do potencial zeta (ZP) das amostras foram conduzidas para avaliar a carga superficial das partículas de biochar e também obter informação a respeito da sua capacidade de sorção em função do pH. O ZP foi estimado em função da oscilação da solução contendo biochar, o que imobilizou as partículas na superfície do copo do equipamento. O fluxo da solução desloca a nuvem de íons móveis em torno de cada partícula para cima e para baixo, criando uma frequência de oscilação. A diferença de potencial criada foi medida como potencial de fluxo e a partir disso, o potencial zeta foi obtido. A FIGURA 27 apresenta os gráficos ZP obtidos com este estudo em função da alteração do pH do meio.

FIGURA 27 – POTENCIAL DE ZETA OBTIDO EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO PH PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR PRECURSOR E ATIVADAS



Para todas as amostras de biochar foi observado que os valores de ZP diminuíram e se tornaram mais negativos com o aumento do pH, o que pode ser correlacionado com a adsorção de ânions presentes em solução, como OH^- e Cl^- , à superfície do biochar [270]. BC apresentou um ZP menos eletronegativo em comparação com as amostras de biochar ativado, sendo este de 20,4 a $-2,28$ mV (TABELA 12). Para as amostras ativadas N1, N3, N4, N5, H1 e H2 as variações de ZP não apresentaram diferenças significativas, com perfis similares. Já as amostras NH e N2 apresentaram valores de ZP significativamente mais eletronegativos, em comparação as demais amostras para qualquer pH avaliado. Isso pode indicar que estas amostras apresentam uma quantidade maior de cargas negativas superficiais, sendo que partículas com valores maiores de potencial zeta (positivo ou negativo) são também consideradas mais estáveis. Normalmente, para caracterizar a estabilização, valores mínimos de ZP acima de ± 30 mV são considerados [271].

Resultados semelhantes foram também relatados por outros autores [268, 272, 273], onde amostras de biochar ativadas apresentaram valores de ZP mais negativos em comparação ao biochar precursor. Os autores sugerem que isso se deve à grande quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio, como COO^- , $-\text{COH}$ e $-\text{OH}$, na superfície do biochar ativado. A partir dos resultados obtidos, foram determinados os pontos isoelétricos (IEP) das amostras de biochar, conforme apresentado na TABELA 12.

TABELA 12 – INTERVALOS DE POTENCIAL ZETA (ZP) E PONTO ISOELÉTRICO (IEP) OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BIOCHAR (N=1)

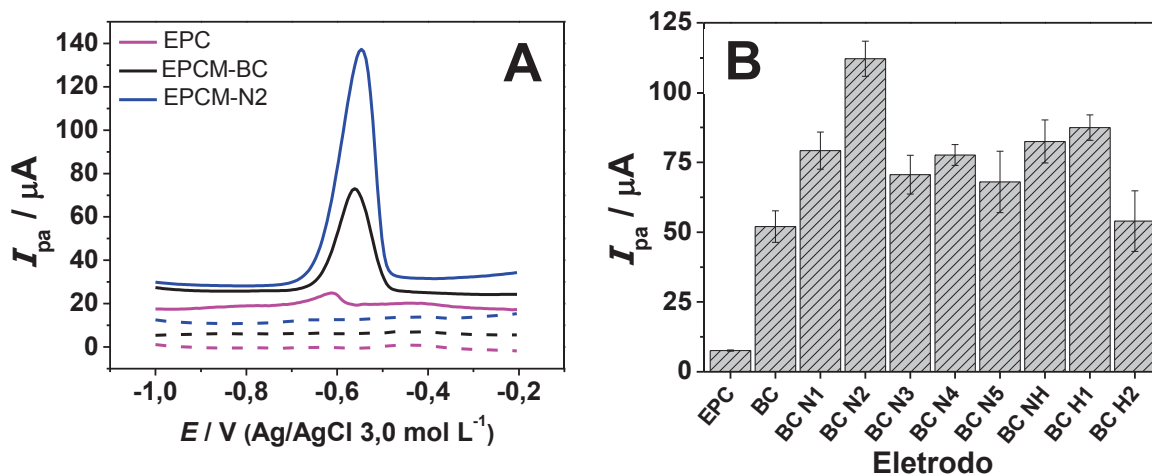
| Amostra | ZP (mV) | IEP |
|---------|--------------|------|
| BC | 20,4 a -2,28 | 7,31 |
| N1 | 19,0 a -12,0 | 5,61 |
| N2 | 34,8 a -38,4 | 4,98 |
| N3 | 21,5 a -12,6 | 5,72 |
| N4 | 20,2 a -8,30 | 5,56 |
| N5 | 17,4 a -12,6 | 5,27 |
| NH | 26,5 a -37,0 | 5,41 |
| H1 | 16,7 a -9,71 | 6,08 |
| H2 | 22,7 a -7,31 | 6,44 |

O IEP está relacionado ao valor de pH no qual o ZP é zero, e representa as cargas superficiais externas do biochar. A carga dos grupos funcionais pode variar dependendo do pH da solução, afetando a capacidade de interação ou adsorção com outras espécies. No entanto, próximo ao valor de IEP é observada a maior capacidade de sorção do material [274]. Valores de IEP entre 4,98 e 7,31 foram obtidos para as amostras de biochar precursor e ativadas. Os resultados indicaram que as cargas superficiais do biochar encontravam-se negativas acima dos valores determinados de IEP, como esperado. O biochar precursor apresentou o maior IEP de 7,31, enquanto as amostras de biochar ativado apresentaram valores menores entre 4,98 e 6,44. O maior IEP pode indicar que o material apresenta menor quantidade de grupos funcionais superficiais, sugerindo que os tratamentos de ativação foram eficientes para aumentar a quantidade destes grupos [275]. Assim, este estudo permitiu prever que a amostra N2, com menor valor de IEP, provavelmente terá maior capacidade de sorção de outras espécies em valores de pH próximos ao IEP, sendo que acima destes valores ocorre o decréscimo dessa capacidade.

4.1.9 Caracterização Voltamétrica

Visando avaliar a influência das diferentes estratégias de ativação na capacidade adsortiva do biochar, as amostras foram utilizadas como modificadores de eletrodos para a pré-concentração de diferentes espécies de interesse analítico. Foram investigadas espécies inorgânicas e orgânicas: íons metálicos Pb(II), Cd(II) e Cu(II); e pesticidas paraquat (PQ) e metil paration (MP). A pré-concentração de cada espécie (individualmente), foi realizada em condição de circuito aberto, durante 5,0 minutos, e sob agitação em solução de acetato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado em 5,0 contendo de $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ da respectiva espécie avaliada. Em seguida, os eletrodos de pasta de carbono com e sem modificação foram submetidos a medidas voltamétricas, na ausência e na presença da etapa de pré-concentração, para obtenção dos sinais de resposta. A FIGURA 28 apresenta os resultados representativos obtidos para as medidas realizadas por DPV, após a pré-concentração de íons Pb(II).

FIGURA 28 – VOLTAMOGRAMAS DE DPV OBTIDOS COM OS ELETRODOS EPC, EPCM-BC E EPCM-N2 ANTES (LINHA TRACEJADA) E APÓS A PRÉ-CONCENÇÃO DE ÍONS Pb(II) $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (LINHA SÓLIDA) (A). INTENSIDADES DE CORRENTE DE PICO OBTIDAS EM FUNÇÃO DE TODOS OS ELETRODOS AVALIADOS (B)



Os voltamogramas apresentados na FIGURA 28-A comprovam que, tanto o EPC quanto os eletrodos modificados com biochar precursor e ativado, apresentaram processos anódicos correspondentes à oxidação de íons Pb(II), registrados em potenciais de -0,61 V utilizando o EPC e -0,55 V para ambos os EPCM (vs. Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹). As linhas tracejadas correspondem aos voltamogramas obtidos antes da etapa de pré-concentração (branco), indicando a ausência de qualquer processo redox. A determinação de íons Pb(II) foi realizada empregando a técnica de *stripping* voltamétrico (redissolução). As reações envolvidas na etapa de medida são representadas a seguir, e correspondem à pré-concentração de íons Pb(II) nos EPC (Reação (4)). Após a etapa de redução dos íons adsorvidos, a etapa de medida (redissolução), com varredura do potencial no sentido positivo, promoveu novamente a oxidação dos íons (Reação (5)), permitindo a sua detecção.

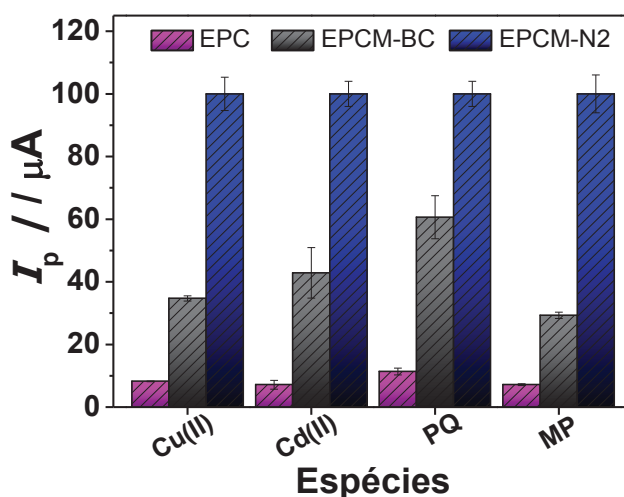


A partir dos resultados apresentados na FIGURA 28-B, pode-se notar que todos os EPCM apresentaram magnitude de sinal de resposta muito superiores em relação ao eletrodo não modificado (EPC). Isso sugere que a incorporação do biochar melhorou a capacidade adsorptiva de todos eletrodos para a pré-concentração de íons Pb(II), acarretando no aumento da intensidade dos sinais de resposta obtidos. Neste sentido, com exceção da amostra H2 (tratada com H₂O₂ 35 %, durante 2,0 horas), não foram constatadas variações significativas entre as respostas obtidas para os eletrodos modificados com as amostras N1, N3, N4, N5, NH e H1, em um intervalo de confiança de 95 % (Teste *t-Student*). Em relação às amostras tratadas com H₂O₂ (H1 e H2) foi constatado que o aumento do tempo de refluxo (1,0 e 2,0 horas, respectivamente) ocasionou a diminuição do sinal de resposta, sendo que em tempos superiores pode ter ocorrido a decomposição do H₂O₂, deixando de apresentar o caráter oxidante, inviabilizando assim a oxidação e/ou o aumento de grupos funcionais da superfície do biochar [40].

Em relação aos resultados obtidos para as amostras tratadas com HNO_3 , não foi observada uma tendência entre as condições de tratamento a que as amostras foram submetidas. Sendo que o aumento da temperatura de refluxo para $90\text{ }^\circ\text{C}$ (amostras N3 e N4) e da concentração de HNO_3 para 75 % (amostra N5) não foram considerados parâmetros determinantes, não apresentando variações significativas nos sinais de resposta registrados. No entanto, o tempo de refluxo de 3,0 horas apresentou melhores resultados do que o tempo de 1,0 hora, sugerindo que o aumento desse parâmetro ocasionou em uma maior formação de grupos superficiais, conforme comprovado pelos resultados obtidos pela titulação de Boehm.

O eletrodo que apresentou os melhores resultados foi construído com a amostra de biochar N2, que foi tratada sob refluxo com HNO_3 50 % (v/v), durante 3,0 horas, em temperatura de $60\text{ }^\circ\text{C}$. Para o EPCM-N2 foi registrado um sinal de resposta 15 vezes superior em comparação ao sinal registrado para o EPC e 2,2 vezes superior em relação ao EPCM-BC, nas mesmas condições empregadas. Com isso, comprova-se que as alterações das propriedades físico-químicas do biochar, geradas após os tratamentos químicos, promoveram melhoras na sua capacidade sortiva e, conseqüentemente no desempenho analítico do sensor. Paralelo a isso, conforme dados mostrados anteriormente, esta amostra apresentou a maior quantidade de defeitos e de grupos ácidos superficiais. Estas características também resultaram em um melhor desempenho voltamétrico para os outros compostos avaliados (FIGURA 29).

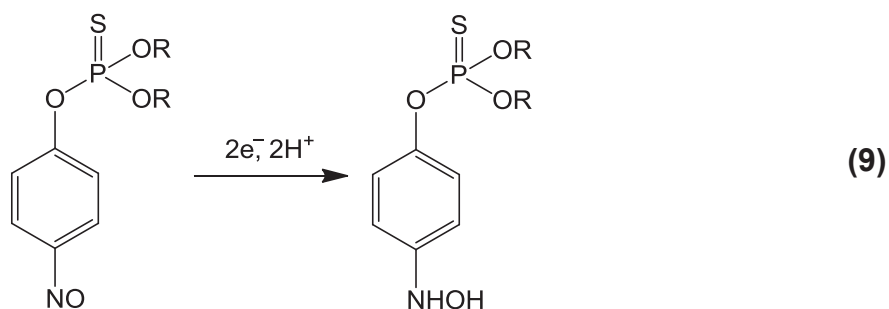
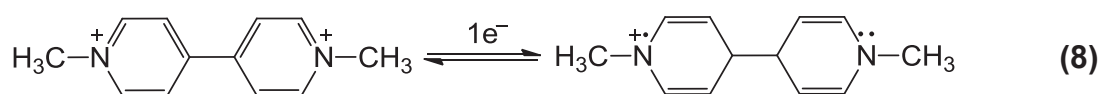
FIGURA 29 – INTENSIDADES DE CORRENTE DE PICO OBTIDAS NA PRESENÇA DE ÍONS Cd(II) , Cu(II) E DOS PESTICIDAS PARAQUAT (PQ) E METIL PARATION (MP)



Os resultados foram obtidos com os eletrodos EPC, EPCM-BC e EPCM-N2, após a pré-concentração de íons Cu(II) e Cd(II), e dos pesticidas PQ e MP. Tais resultados correspondem aos sinais de resposta registrados para as Reações de oxidação **(6)** e **(7)** dos íons Cu(II) e Cd(II), seguindo as reações expostas anteriormente para a oxidação de íons Pb(II).



Os pesticidas foram avaliados pelas reações de redução, ambas registradas em potencial de pico de -0,55 V (vs. Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹). Para o PQ foi monitorado o seu primeiro processo catódico, referente à redução reversível envolvendo a formação do cátion radical PQ^{•+} (Reação **(8)**) [276]. E a reação reversível do MP foi promovida pela redução do grupamento nitro a hidroxilamina, conforme apresentado na Reação **(9)** [277].



Destaca-se que os mecanismos de interação do biochar são diferentes para compostos inorgânicos e orgânicos. Para espécies inorgânicas, um trabalho anterior revelou que as interações do biochar de farelo de mamona são promovidas por um mecanismo de quimiossorção, seguindo o modelo de pseudo-segunda ordem [233]. Assim, como comprovado pela análise do potencial zeta, as amostras de biochar apresentaram uma superfície negativamente carregada após o valor de pH de 4,98. Estas cargas favorecem as interações do biochar com espécies catiônicas eletrostaticamente, por troca iônica e/ou complexação [7, 33].

A capacidade de interação das amostras de biochar para a pré-concentração de íons metálicos seguiu a ordem de preferência: Pb(II) > Cd(II) > Cu(II) > Ni(II). Esse comportamento pode estar relacionado ao raio iônico e à energia de hidratação dos íons. Considerando que os cátions avaliados possuem o mesmo estado de oxidação, a preferência de interação aumenta com o menor raio iônico hidratado [278]. Os íons Pb(II) apresentam um menor raio iônico hidratado em comparação com os demais íons, favorecendo sua mobilidade para interação com os grupos funcionais do biochar. Para os outros íons, a preferência de interação pode estar relacionada à energia de hidratação. Esses resultados são consistentes com outros estudos relatados na literatura, nos quais a menor energia de hidratação promoveu a maior capacidade de interação [279, 280].

Já em relação às espécies orgânicas, é necessário ressaltar que o pesticida PQ também é um composto catiônico [21, 281], o que pode ter favorecido a sua melhor interação com o biochar, a partir de mecanismos mistos de fisiossorção e quimiossorção. O pesticida MP é uma molécula neutra [282, 283], e provavelmente se liga ao biochar por ligações de hidrogênio que podem ocorrer entre os grupos oxigenados e nitrogenados do biochar com o grupamento nitro do MP. Além disso, um mecanismo envolvendo interações do tipo π - π entre o anel aromático do pesticida e a parte carbonácea do biochar também pode ocorrer [61, 284, 285].

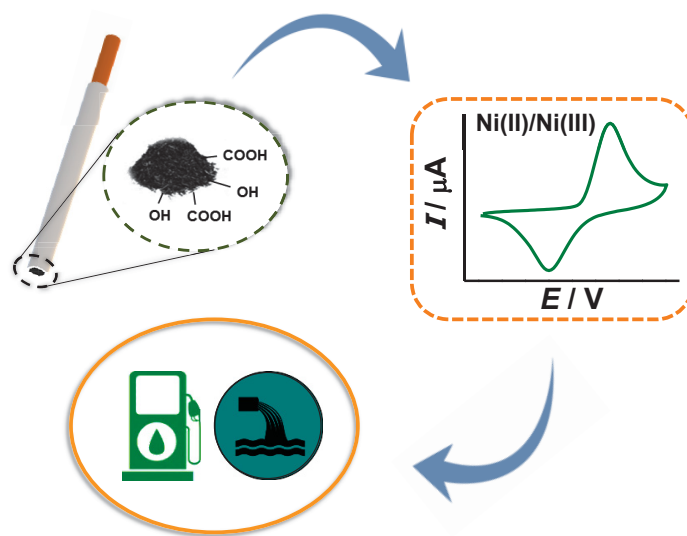
4.1.10 Conclusões Parciais para a Obtenção de Biochar Ativado

Nesta primeira etapa, amostras de biochar foram obtidas e tratadas com diferentes estratégias de ativação química com HNO_3 e/ou H_2O_2 , e apresentaram variações físico-químicas, principalmente em relação as características morfológicas, estruturais e elementares, em comparação à amostra precursora (BC). De maneira geral, comparando todos os resultados obtidos pelas análises de caracterização, destaca-se que as amostras tratadas com HNO_3 apresentaram variações mais significativas.

As amostras de biochar tratadas apresentaram elevada capacidade de pré-concentração e detecção para as diferentes sondas eletroquímicas inorgânicas e orgânicas avaliadas. A amostra N2, obtida por refluxo com HNO_3 50 % (v/v) durante 3 horas e em temperatura de 60 °C, apresentou os melhores resultados para a pré-concentração destas espécies, o que foi relacionado a maior quantidade de grupamentos funcionais oxigenados incorporados à superfície do material, melhorando assim a sua capacidade de interagir com as espécies.

Assim, o eletrodo EPCM-N2 demonstrou maior potencialidade eletroanalítica, comparado aos demais eletrodos avaliados, e foi escolhido para o desenvolvimento das metodologias analíticas que serão descritas nas próximas seções dos resultados.

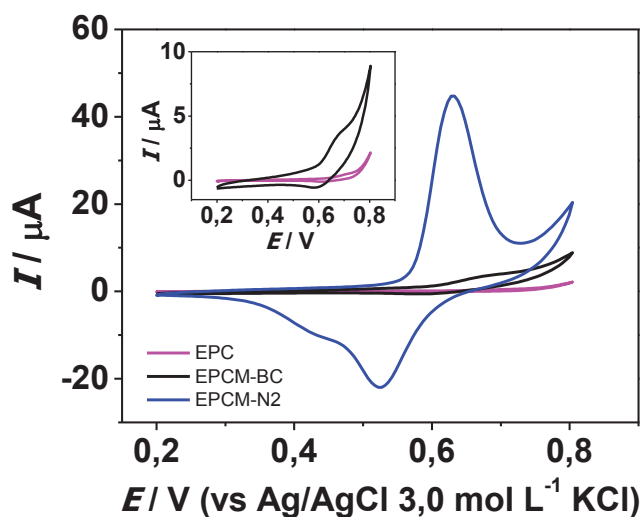
4.2 DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL EM AMOSTRAS DE BIOETANOL COMBUSTÍVEL E ÁGUA RESIDUÁRIA



4.2.1 Comportamento Eletroquímico do EPCM-N2

Evidenciada a potencialidade do EPCM com a amostra de biochar ativado N2 em pré-concentrar íons metálicos de maneira mais efetiva, o EPCM-N2 foi avaliado na pré-concentração de íons Ni(II), com o intuito de monitorar a formação do par redox Ni(II)/Ni(III), em meio básico. A etapa de pré-concentração foi realizada em solução acetato de sódio com pH ajustado em 7,0, contendo $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de níquel (II), durante 10 minutos, sob agitação constante e em condições de potencial de circuito aberto (sem aplicação de potencial). Após a pré-concentração de íons Ni(II), o eletrodo foi submetido a medidas de voltametria cíclica com a finalidade da formação do par redox Ni(II)/Ni(III). Os parâmetros empregados foram: faixa de potencial de 0,2 a 0,8 V, 100 ciclos, velocidade de varredura (v) de 50 mV s^{-1} e KOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. As medidas foram realizadas para os eletrodos não modificado (EPC) e modificados com biochar precursor (EPCM-BC) e biochar ativado N2 (EPCM-N2), conforme apresentado na FIGURA 30.

FIGURA 30 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O EPC (—), EPCM-BC (—) E EPCM-N2 (—) APÓS PRÉ-CONCENTRAÇÃO NA PRESENÇA DE ÍONS Ni(II) $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. NO DETALHE: VOLTAMOGRAMAS NA AUSÊNCIA DO EPCM-N2, PARA EFEITO COMPARATIVO. v : 50 mV s^{-1}

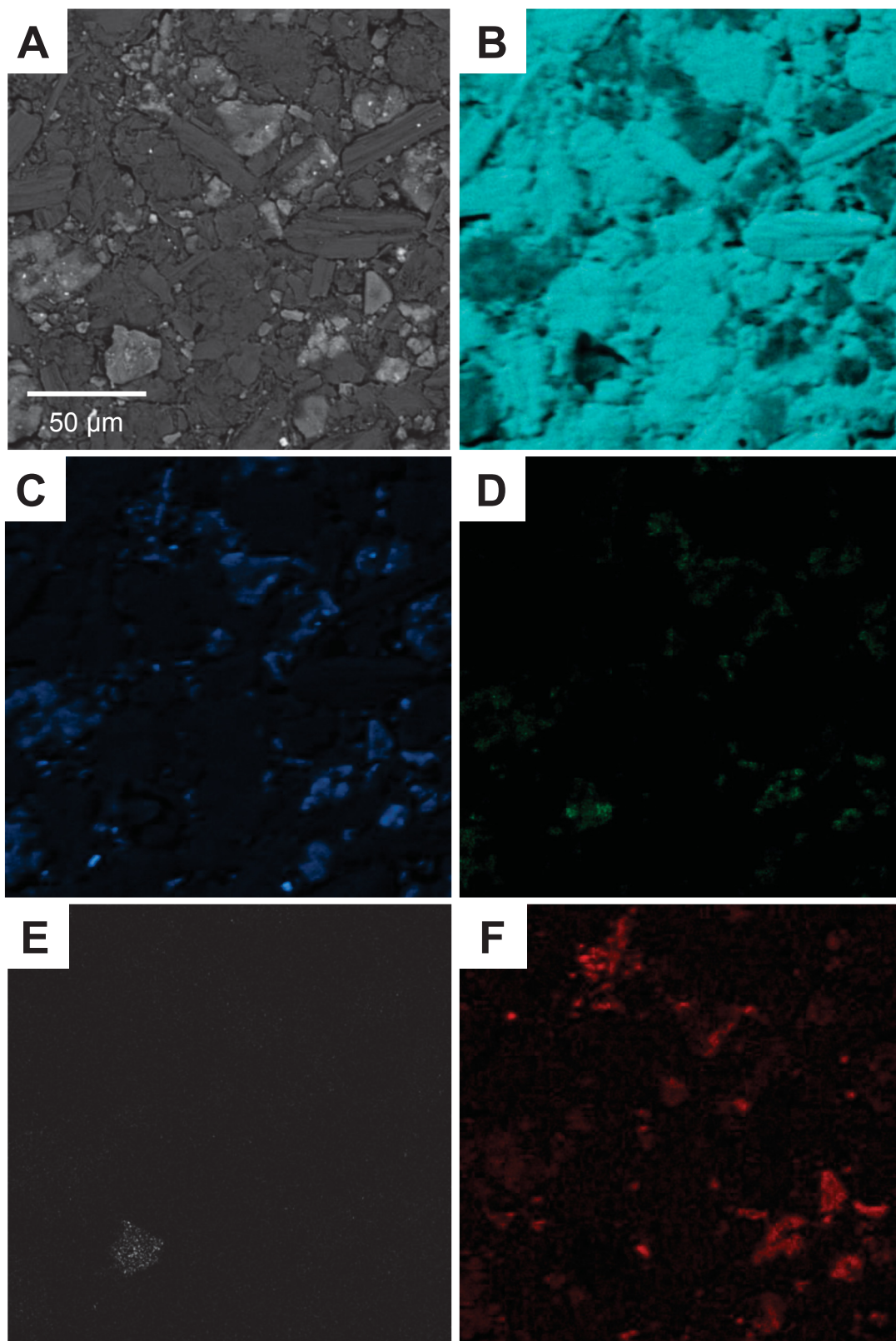


A partir dos resultados apresentados é possível notar que para ambos os eletrodos modificados houve a presença dos sinais faradâicos referentes ao processo de oxidação do hidróxido de níquel (II) para o oxi-hidróxido de níquel (III), em potencial de 0,60 V, e o processo referente à reação reversa de redução do oxi-hidróxido de níquel (III), em 0,52 V (vs Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹). Os sinais de resposta evidenciam a presença de íons Ni(II) na superfície destes eletrodos, comprovando a capacidade do biochar em pré-concentrar estes íons.

Porém, conforme pode ser observado pelo gráfico inserido, o EPC não modificados e o EPCM-BC apresentaram intensidades de corrente de pico pouco mensuráveis. Já para o EPCM-N2 foram observados sinais com melhor definição e com maiores intensidades de correntes anódica e catódica. Com isso, torna-se evidente que o eletrodo modificado com a amostra de biochar ativado (EPCM-N2) possui maior potencialidade em pré-concentrar íons Ni(II) espontaneamente, com relação ao material não tratado. Isto credencia o dispositivo proposto para ser aplicado como um sensor voltamétrico para a determinação de íons Ni(II) empregando a metodologia proposta.

Para compreender melhor as interações entre íons Ni(II) e os grupos superficiais presentes no biochar, realizou-se um estudo de mapeamento químico da superfície do EPCM-N2. Para isso, a etapa de pré-concentração foi conduzida na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Ni(II), posteriormente, a pasta de carbono contendo o analito pré-concentrado foi removida do suporte de eletrodos e disposta sobre um suporte de alumínio específico. A superfície da pasta foi analisada por EDS, acoplado ao microscópio eletrônico de varredura. Com isso, foi obtida uma imagem representativa desta superfície, e sobre esta mesma área foram realizadas varreduras por EDS monitorando diferentes elementos químicos, de forma isolada. Para cada elemento foi gerada uma imagem de MEV, na mesma região definida anteriormente, com uma coloração diferente atribuída para cada elemento químico analisado. A FIGURA 31 mostra a imagem de MEV representativa da pasta, com ampliação de 1.500 vezes, e os espectros de EDS subsequentes obtidos para os elementos: carbono, oxigênio, nitrogênio, enxofre e níquel.

FIGURA 31 – IMAGEM DE MEV, COM AUMENTO DE 1500 VEZES, (A) E MAPEAMENTO QUÍMICO OBTIDO POR EDS PARA A SUPERFÍCIE DO EPCM-N2 CORRESPONDENTE AOS ELEMENTOS: CARBONO (B), OXIGÊNIO (C), NITROGÊNIO (D), ENXOFRE (E) E NÍQUEL (F)



Pela região da pasta de carbono analisada (FIGURA 31-A), representativa de toda a superfície do eletrodo, foi possível distinguir a estrutura do biochar e do grafite, sendo este último representado pela área mais escura da imagem. A presença de carbono (FIGURA 31-B) foi majoritariamente observada em toda a região da imagem, o que já era esperado, devido ao carbono ser constituinte do grafite e também do biochar. Nas FIGURAS 31-C, D e E foram observadas quantidades significativas de oxigênio e nitrogênio, e uma pequena quantidade de enxofre, respectivamente. A presença de níquel foi confirmada pelo mapeamento químico mostrado na FIGURA 31-F e do espectro de EDS obtido para a linha de energia atribuída ao níquel (Ni L α). Com isso, analisando todas as imagens obtidas, verificou-se que a presença de níquel (região vermelha) ocorre principalmente em áreas concomitantes com a região azul, associada à presença de oxigênio (O K α), e em menor distribuição com região verde, correspondente ao nitrogênio (N K α). Esta sobreposição, entre a presença de oxigênio e níquel, pode demonstrar que a interação de íons Ni(II) ocorre preferencialmente com grupos funcionais oxigenados do biochar. Além disso, o tratamento de ativação com HNO₃ também proporcionou um aumento da quantidade de nitrogênio no material, sugerindo a formação de grupos funcionais nitrogenados, e que também podem ter contribuído para a maior interação de íons Ni(II) com a superfície do biochar.

Paralelo à constatação do aumento de grupos funcionais na amostra de biochar ativado, análises foram realizadas visando avaliar as características morfológicas sobre a área superficial e a porosidade das amostras de biochar antes e após o tratamento de ativação. Foram realizadas medidas empregando o método proposto por B.E.T., cujos resultados podem ser visualizados na TABELA 13.

TABELA 13 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR OBTIDAS PELO MÉTODO DE B.E.T.

| Amostra | Área superficial (m ² g ⁻¹) | Volume de poros (cm ³ g ⁻¹) | Diâmetro de poros (Å) |
|---------|---|---|--------------------------|
| BC | 4,80 | 3,34 x 10 ⁻³ | 35,8 |
| N2 | 6,15 | 5,93 x 10 ⁻³ | 40,7 |

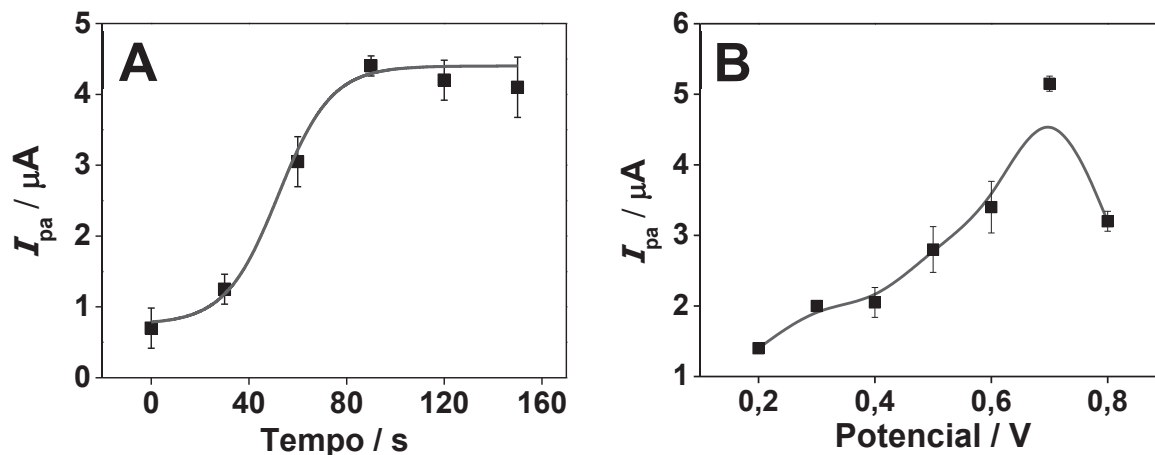
Os dados constantes na TABELA 13 permitem notar que a amostra de biochar ativado N2 apresentou um aumento na área superficial e porosidade (volume e diâmetro dos poros), em comparação ao biochar precursor. Após o tratamento com HNO₃, pode ocorrer simultaneamente à geração de grupos funcionais superficiais e a abertura de estruturas microporosas, aumentando a área superficial do material [47]. Conforme abordado anteriormente, o tratamento de ativação pode causar efeitos erosivos no biochar, alterando a sua estrutura porosa [248]. Assim, pode ocorrer a expansão de microporos em mesoporos ou macroporos, a partir da formação e reestruturação de grupos funcionais na superfície do biochar [286, 287]. Isto é concordante com o aumento do volume e diâmetro de poros do biochar após o processo de ativação. Com base nestes resultados, é possível supor que o aumento da porosidade e da área superficial são características que podem corroborar para a capacidade de adsorção de íons Ni(II) na superfície do biochar.

4.2.2 Otimização dos Parâmetros Experimentais para Determinação de Níquel

Na presente tese, foram apresentados alguns dos resultados obtidos para a otimização dos parâmetros experimentais relacionados a determinação de níquel, sendo estes o tempo e potencial de condicionamento, pH e tempo de pré-concentração de íons Ni(II).

A reação de formação do oxi-hidróxido de níquel (III) a partir do hidróxido de Ni(II), foi realizada pela varredura cíclica de potencial, em meio básico. Aliado a isso, foi verificado que a adição de uma etapa de condicionamento do eletrodo, prévia a etapa de varredura, promoveu uma melhora do sinal de resposta monitorado. Desta forma, foi avaliada a influência das condições desta etapa de condicionamento na formação do par Ni(II)/Ni(III). Esta etapa promove a polarização positiva do eletrodo previamente à etapa de medida. Assim, o tempo de condicionamento foi estudado com a aplicação de potencial de 0,65 V, em períodos de tempo de 0 a 150 s, e o potencial aplicado foi avaliado de 0,2 a 0,8 V. Para cada medida realizada foi monitorada a intensidade de corrente de pico anódica (n=3). Os resultados obtidos para estes estudos são apresentados na FIGURA 32.

FIGURA 32 – CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA OBTIDA PARA ÍONS Ni(II) COM A VARIAÇÃO DO TEMPO (A) E DO POTENCIAL APLICADO (B) DURANTE A ETAPA DE CONDICIONAMENTO



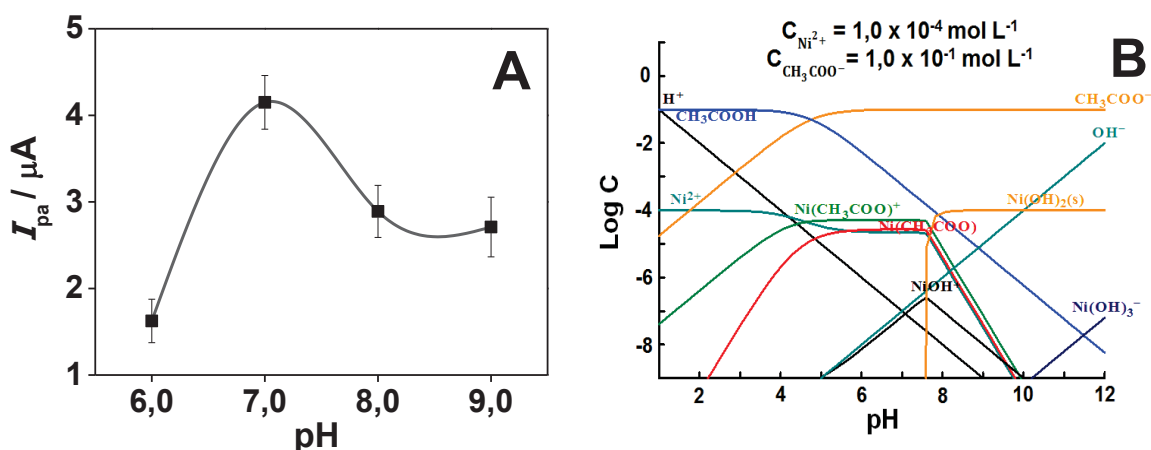
Pela FIGURA 32-A foi observado o aumento no sinal de resposta proporcional ao aumento do tempo de condicionamento, até o máximo observado para o tempo de 90 s. Este aumento da intensidade de corrente para tempos maiores sugere que quanto maior o tempo de polarização do eletrodo, maior será a formação de NiOOH. Após este valor não se observou diferença significativa no sinal de resposta para o níquel, indicando que, provavelmente, não ocorreu o aumento da formação desta espécie, limitada pela quantidade de íons Ni(II) na superfície eletródica.

De acordo com os resultados apresentados na FIGURA 32-B, também foi constatado um aumento do sinal de corrente anódica em função do aumento do potencial aplicado. O melhor sinal de resposta foi observado com a aplicação de um potencial de 0,70 V, após isto houve um decaimento da intensidade da corrente de pico. Uma possível causa deste decréscimo é a geração de gases na superfície do eletrodo, ou no interior da pasta de carbono, em decorrência do potencial mais positivo ser suficiente para promover a eletrólise do solvente. Assim, a etapa de condicionamento foi realizada com aplicação de potencial de 0,70 V durante 90 s. É importante destacar que esta etapa não está associada com a etapa de pré-concentração, onde íons Ni(II) são apenas incorporados a superfície eletródica. A reação do par redox Ni(II)/Ni(III) ocorre em meio básico pela varredura de potencial, e a aplicação de um potencial elétrico na etapa de condicionamento polariza o eletrodo, o que pode favorecer a formação

eletroquímica do oxi-hidróxido de níquel (III), conforme relatado também por outros trabalhos da literatura [80, 84].

Em seguida, foram realizados estudos para avaliar o pH da solução de pré-concentração (acetato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) de íons Ni(II). Os valores de pH estudados foram de 6,0 a 9,0, com o tempo de pré-concentração fixado em 10 minutos, em condições de circuito aberto e sob agitação constante. Os resultados são apresentados na FIGURA 33-A.

FIGURA 33 – CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA ($N=3$) E A VARIAÇÃO DO pH DA SOLUÇÃO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (ACETATO DE SÓDIO $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) (A). DIAGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES OBTIDO PARA O NÍQUEL NA PRESENÇA DE TAMPÃO ACETATO (B).

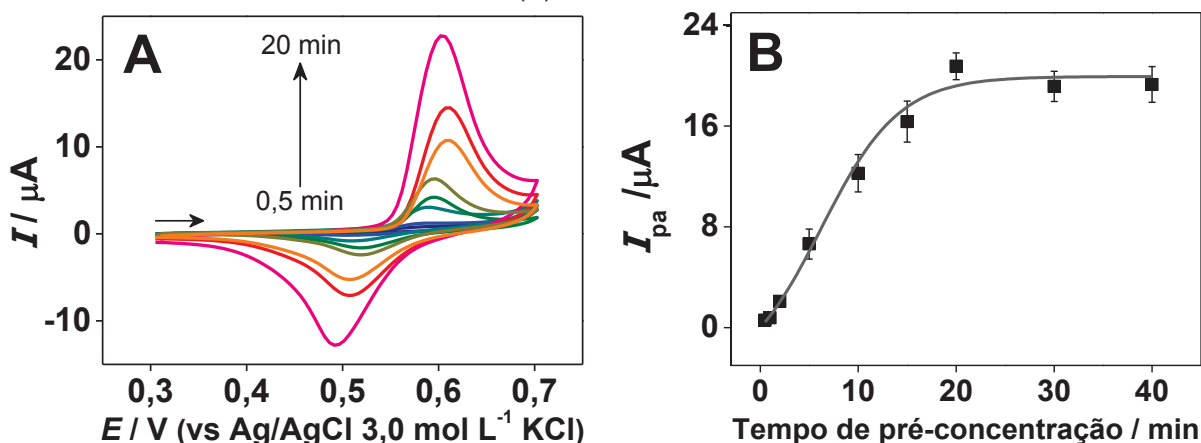


O aumento da intensidade de corrente de pico referente à oxidação do níquel foi observado à medida que o pH da solução foi elevado de 6,0 para 7,0. Em pH abaixo de 7,0 há uma maior quantidade de íons H^+ presentes em solução, e que competem com os íons Ni(II) pelos sítios ativos presentes no biochar, fazendo com que menores quantidades do analito cheguem à superfície eletródica. Este comportamento corrobora com as informações fornecidas pelo diagrama de distribuição de espécies de Ni(II) em solução (FIGURA 33-B), obtido com o programa computacional *Hydra Medusa* (Versão 2009). Em valor de pH igual a 7,0 tem-se a presença de espécies de níquel protonadas (Ni^{2+} , $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})^+$ e NiOH^+) em solução, mais suscetíveis a pré-concentração. Acima deste valor de pH ocorre o decréscimo das espécies de níquel protonadas, como consequência da hidrólise de parte dos íons Ni(II) em solução, levando à formação, principalmente, de $\text{Ni}(\text{OH})_2(\text{s})$, uma espécie insolúvel [288]. Esta

espécie não se encontra disponível para a pré-concentração na superfície eletródica, o que reflete no decréscimo da intensidade dos sinais de resposta observados para os valores de pH de 8,0 e 9,0. Assim, a melhor resposta frente à pré-concentração de íons Ni(II) foi observada para a solução de acetato de sódio com valor de pH ajustado em 7,0, empregada para as medidas posteriores.

Por fim, foi realizado o estudo da influência do tempo de pré-concentração na resposta voltamétrica, pela imersão do eletrodo na solução de pré-concentração. Neste estudo, o eletrodo permaneceu em solução durante períodos de tempo que variaram de 30 segundos a 40 minutos. Os resultados são apresentados a seguir na FIGURA 34.

FIGURA 34 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS (A) E CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA (N=3) E A VARIAÇÃO DO TEMPO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (B). v : 50 mV s^{-1}



Os resultados obtidos permitem verificar que o aumento do tempo de contato do eletrodo na solução de pré-concentração apresentou uma correlação direta com aumento dos sinais voltamétricos de resposta. Este aumento foi observado até 20 minutos de pré-concentração, sendo que após este valor a intensidade do sinal de resposta permaneceu constante. Isto pode ser explicado pela possível saturação dos sítios ativos superficiais do biochar presentes no eletrodo, ou pela existência de um equilíbrio entre a quantidade de íons Ni(II) em solução e a quantidade de sítios adsorventes. Este mesmo perfil também foi relatado anteriormente em outros trabalhos que utilizaram EPC modificados com biochar para a pré-concentração espontânea e determinação de diferentes analitos [233]. Contudo, o tempo de pré-concentração de 20 minutos poderia

afetar a frequência analítica do método, por este motivo, foi escolhido o menor tempo em que se pudessem obter resultados com sinais de resposta significativos, sendo este o tempo de 5,0 minutos.

A TABELA 14 relaciona todos os parâmetros experimentais avaliados com as condições otimizadas para determinação de níquel. As condições ótimas foram escolhidas de acordo com os melhores sinais de resposta, isto é, a corrente de pico mais elevada registrada e o menor desvio padrão entre as medições (n=3).

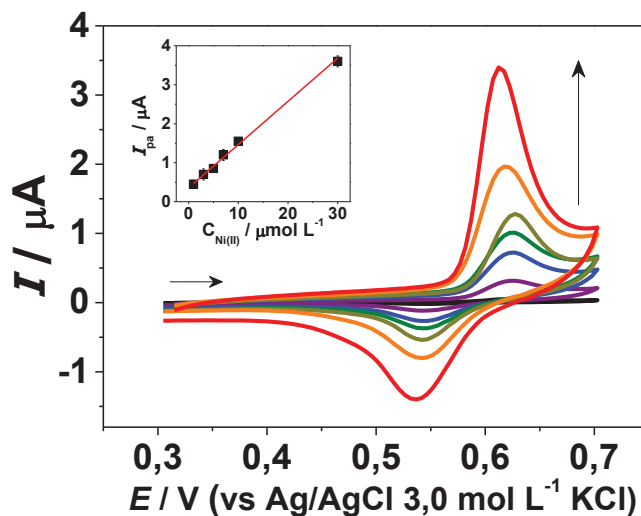
TABELA 14 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÍONS NI(II)

| Parâmetro | Condições de Compromisso |
|------------------------------|---|
| Proporção de biochar | 15 % (m/m) |
| Potencial de condicionamento | 0,70 V |
| Tempo de condicionamento | 90 s |
| Solução de pré-concentração | Acetato de sódio pH 7,0 |
| Tempo de pré-concentração | 5,0 min |
| Eletrólito suporte | KOH $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ |
| Velocidade de varredura | 50 mV s^{-1} |

4.2.3 Desempenho Analítico do EPCM-N2

Para avaliar o desempenho analítico do sensor proposto na determinação de íon Ni(II), medidas voltamétricas foram realizadas com os parâmetros experimentais otimizados, utilizando concentrações de íons Ni(II) que variaram de 1,0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A FIGURA 35 apresenta os voltamogramas cíclicos e a curva analítica obtidos (n=3) para este estudo.

FIGURA 35 – CURVA ANALÍTICA (INSERIDA) E VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS Ni(II): 1,0 A 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. v : 50 mV s^{-1}



A curva analítica apresentou uma região linear na faixa de concentração entre 1,0 e 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Ni(II) com sensibilidade de 0,111 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$, seguindo a equação linear: $I (\mu\text{A}) = 0,111 C_{\text{Ni(II)}} (\mu\text{mol L}^{-1}) + 0,358$. Posteriormente, foram obtidos os valores de limite de detecção (**LOD**) e limite de quantificação (**LOQ**) para determinação de Ni(II), calculados empregando as Equações (2) e (3), respectivamente. Onde, **SD** corresponde ao desvio padrão do branco e **b** ao coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade) [289, 290]. Estas equações foram adotadas para os cálculos de LOD e LOQ de todos os métodos analíticos estudados neste trabalho.

$$LOD = 3 \frac{SD}{b} \quad (2)$$

$$LOQ = 10 \frac{SD}{b} \quad (3)$$

Assim, foram obtidos os valores de LOD e LOQ de 1,45 e 4,85 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O método analítico utilizando o EPCM-N2 foi comparado com outros trabalhos relatados na literatura para a determinação de níquel em diferentes amostras e diferentes eletrodos. Diversos métodos para determinação de níquel empregam a técnica de redissolução (*stripping*) com pré-concentração espontânea do analito, como pode ser observado a seguir na TABELA 15.

TABELA 15 – COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO ELETROQUÍMICO APLICADO PARA A DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL

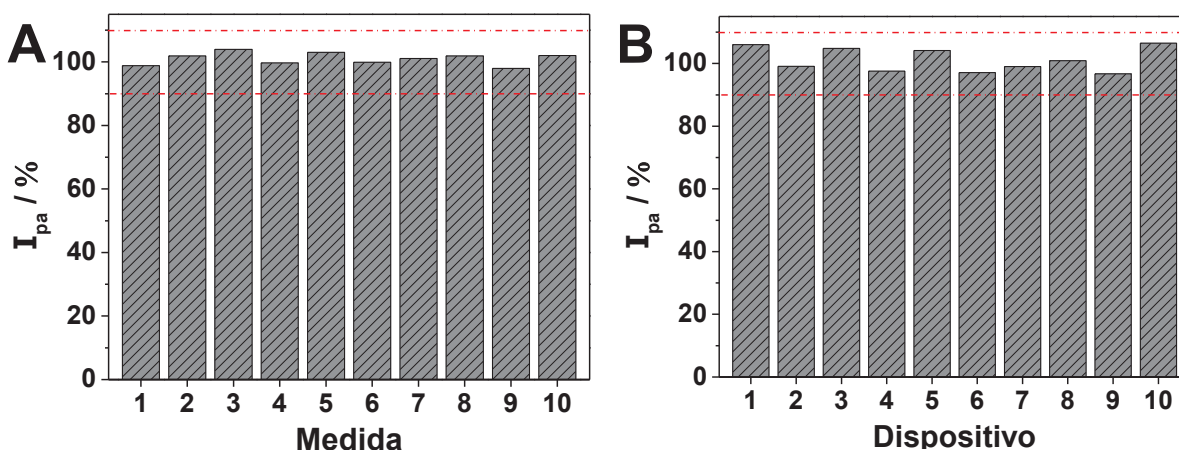
| Amostra | Eletrodo | Agente Complexante | Técnica | t (s) | Ep (mV) ^a | Ref. |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|-----------|------------------------|----------------------|----------------------|
| <i>Bioetanol combustível e água</i> | <i>EPCM-N2</i> | <i>Não necessita</i> | <i>CV</i> | <i>300^b</i> | <i>630</i> | <i>Este trabalho</i> |
| Água industrial de descarte | DMG-N/SPE | DMG | DPV | 120 ^b | -1120 | [171] |
| Etanol combustível | SiAt-SPCPE | DMG | DPV | 1200 ^b | -850 | [177] |
| Etanol combustível | EPCM | DMG | DPV | 1500 ^b | -1125 | [291] |
| Água de rio | BiFE | DMG | SWV | 90 ^c | -1080 | [292] |
| Vegetais e água | MWCNTs | CP(II) | SWV | 60 ^c | -900 | [293] |
| Água da neve | PbF-SPE | DMG | SWV | 90 ^c | -900 | [294] |

^aversus eletrodo de referência Ag/AgCl; ^bpré-concentração espontânea; ^cpré-concentração com aplicação de potencial. t: Tempo de Pré-concentração; Ep: Potencial de pico; EPCM-N2: Eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar ativado com HNO₃; DMG-N/SPE: Eletrodo impresso comercial modificado com dimetilglioxima em Nafion; SiAt-SPCPE: Eletrodo de pasta de carbono com parafina modificado com sílica funcionalizada com 2-aminotiazol; EPCM: Eletrodo de pasta de carbono modificado com dimetilglioxima; BiFE: Eletrodo de filme de bismuto; MWCNT: Eletrodo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas; CP(II): Complexo de Cloro-paládio (II); PbF-SPE: Eletrodo impresso modificado com filme de chumbo.

Com relação ao método proposto, cabe ressaltar que a quantificação de íons Ni(II) pelo monitoramento do par Ni(II)/Ni(III) em meio básico ainda não são relatadas na literatura. Diferentemente de outros procedimentos voltamétricos, que normalmente exploram as reações de oxidação do níquel para a formação de Ni(II), e são monitoradas em potenciais mais negativos. Além disso, agentes complexantes precisam ser utilizados para a pré-concentração dos íons na superfície dos eletrodos [171]. Assim, neste trabalho foi possível realizar a determinação de íons Ni(II) em uma região de potencial que não apresenta a limitação da reação de evolução de hidrogênio, e sem a utilização de agentes complexantes. Levando em consideração que o tempo de imersão do eletrodo é um fator predominante para assegurar a frequência analítica de um método analítico, foi possível constatar que o dispositivo proposto apresentou um tempo de pré-concentração satisfatório, e comparável aos demais métodos. É importante ressaltar que os trabalhos relatados com menor tempo de pré-concentração realizaram esta etapa mediante a aplicação de potencial elétrico.

Em seguida, foram avaliadas a repetibilidade e a reprodutibilidade dos eletrodos nas condições otimizadas, com a realização de dez medidas sucessivas com o mesmo eletrodo e com dez eletrodos diferentes, respectivamente, na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de íons Ni(II). Os estudos foram realizados utilizando os parâmetros analíticos já otimizados na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de íons Ni(II). As intensidades de corrente de pico anódico obtidas pelas medidas voltamétricas apresentaram desvios padrão relativos (RSD) de $\pm 1,89 \%$ para a repetibilidade e de $\pm 3,56 \%$ para reprodutibilidade (FIGURA 36). Isso demonstra que tanto os eletrodos construídos quanto o método proposto podem ser empregados com confiabilidade analítica para medidas sucessivas, sem perda de sinal analítico.

FIGURA 36 – VALORES DE CORRENTE RELATIVA OBTIDOS PARA MEDIDAS CONSECUTIVAS DE NÍQUEL PARA AVALIAR A REPETIBILIDADE (A) E A REPRODUTIBILIDADE (B)

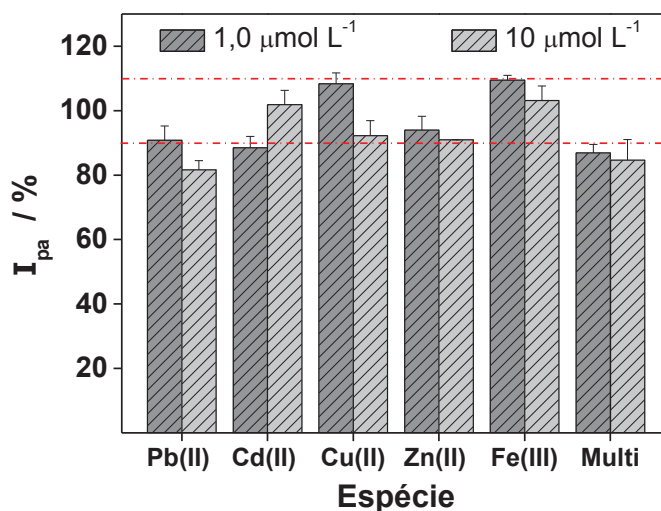


4.2.4 Efeito de Espécies Concomitantes

O biochar apresenta uma elevada capacidade em adsorver e interagir com diferentes espécies, principalmente inorgânicas. Desta forma, a presença de íons metálicos pode interferir no sinal de resposta do níquel, por interação competitiva com grupos superficiais do biochar, na etapa de pré-concentração, suprimindo ou sobrepondo-se ao sinal do níquel. Para este estudo, algumas substâncias potencialmente interferentes foram avaliadas, pois poderiam estar presentes, mesmo em baixas concentrações, nas amostras de etanol combustível ou de água de descarte. Foram avaliados os íons Pb(II), Cu(II), Fe(III), Cd(II) e

Zn(II) separadamente e combinados em uma solução multicomponente. Estas espécies foram adicionadas à solução de pré-concentração em três níveis de concentração de 1,0; 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, contendo 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de íons Ni (II). A FIGURA 37 mostra a relação entre as intensidades de corrente anódica obtidas para o Ni(II) na presença das espécies concomitantes, em concentrações de 1,0 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

FIGURA 37 – CORRENTES DE PICO RELATIVAS OBTIDAS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES CONCOMITANTES EM CONCENTRAÇÕES DE 1,0 E 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ PARA A DETERMINAÇÃO DE ÍONS Ni(II)

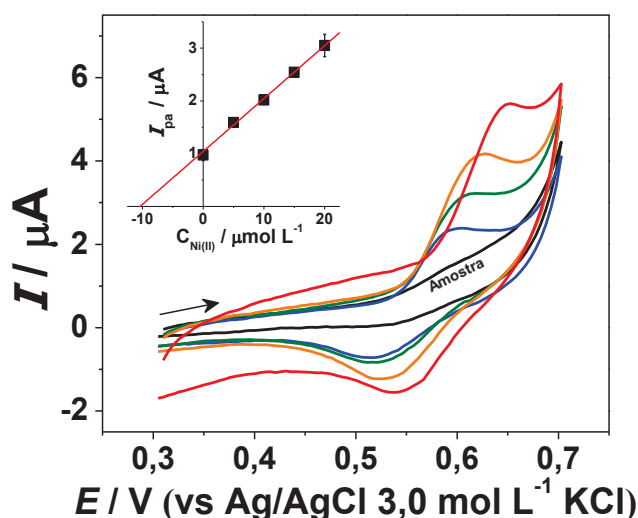


Com base nos resultados obtidos, não foram verificadas influências significativas de sinal quando na presença das espécies avaliadas em concentrações menores e iguais à concentração de Ni(II), com exceção da presença de íons Pb(II) em concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, que apresentou uma interferência de -15 %. Neste caso, a presença deste íon pode ter causado a inibição da adsorção de íons Ni(II) na superfície do eletrodo, competindo e ocupando os sítios ativos do biochar [295]. Uma interferência significativa no sinal de resposta para a solução multielementar, em concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (não mostrado) foi observada. É importante destacar que normalmente a concentração de compostos inorgânicos encontrados em combustíveis e águas é menor do que 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [169, 174]. Contudo, levando em conta que algumas substâncias poderiam causar variações nos sinais de resposta para a determinação de Ni(II), pôde-se empregar o método de adição de analito, visando diminuir e/ou inibir o efeito de possíveis interferências.

4.2.5 Determinação de íons Ni(II) em Amostras de Bioetanol e Água Residuária

A validação da metodologia para a determinação de níquel foi realizada em amostras de bioetanol combustível e de água residuária fortificadas com solução de padrão de íons Ni(II), empregando o método de adição de padrão. A amostra de bioetanol foi fortificada com $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Ni(II). A amostra de água natural foi fortificada com $17 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Ni(II), concentração média da curva analítica, e também metade da concentração máxima permitida pela Resolução do CONAMA 430/2011 para Padrões de Descarte de Efluentes. Os resultados obtidos com a curva de adição de padrão e os voltamogramas correspondentes a estas adições para a amostra de bioetanol são apresentados na FIGURA 38.

FIGURA 38 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E CURVA DE ADIÇÃO DE PADRÃO (INSERTADA) OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL NA AMOSTRA DE BIOETANOL



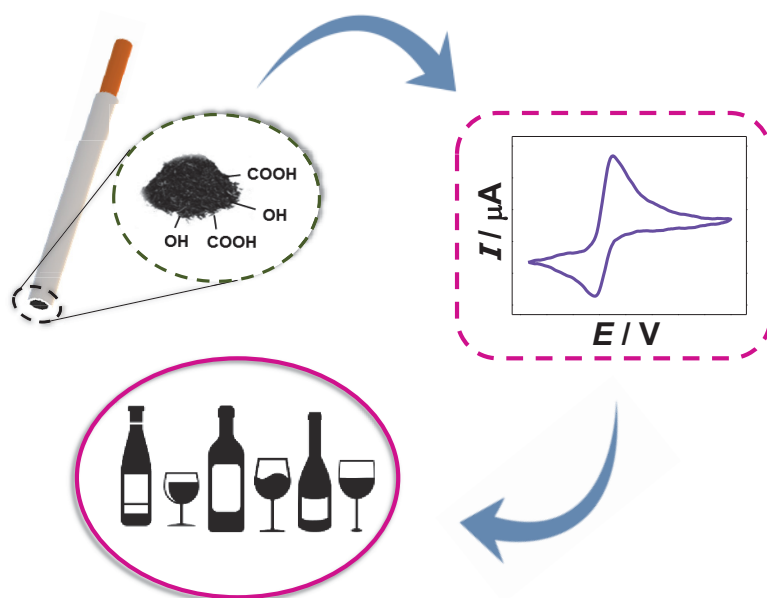
De posse dos valores de concentrações adicionados e recuperados foi possível calcular as quantidades de Ni(II), com percentuais de recuperação de 103 e 109 % para as amostras de bioetanol e água, respectivamente. Isto demonstra que o método proposto foi eficiente para a quantificação de níquel em amostras reais enriquecidas com Ni(II), com valores de recuperação concordantes com a concentração a adicionada, em um nível de confiança de 95 % (teste estatístico *t-Student*). Além disso, com estes resultados obtidos, é possível constatar que a determinação de níquel nestas amostras não sofreu efeitos de matriz, ou seja, as substâncias estudadas como possíveis interferentes, e que

poderiam estar presentes nas amostras, não afetaram de maneira significativa a sensibilidade do dispositivo proposto. O que sugere que a presente proposta pode ser utilizada como uma metodologia alternativa para a determinação de níquel em matrizes de águas e combustíveis, ou similares.

4.2.6 Conclusões Parciais para a Determinação de Níquel

Esta estratégia propôs uma metodologia alternativa para a determinação de íons Ni(II), a partir do monitoramento do par redox Ni(OH)₂/NiOOH. Estes processos são verificados em potenciais mais brandos em comparação ao processo de redução de íons Ni(II), convencionalmente relatado em outros trabalhos. O método proposto mostrou-se viável, uma vez que conseguiu estabelecer uma relação entre a intensidade de corrente registrada com a concentração de íons Ni(II) em solução. Além disso, destaca-se que para este método não houve a necessidade de se utilizar agentes complexantes para a pré-concentração do analito, sendo que o biochar apresenta uma elevada capacidade de interação com íons metálicos, e que pôde ser favorecida com os tratamentos de ativação química, conforme evidenciado em comparação ao EPC e EPCM-BC. Vale considerar que tanto os eletrodos de pasta de carbono, quanto o modificador biochar, apresentam-se como plataformas simples e de baixo custo, possibilitando determinações de maneira menos onerosa e com respostas voltamétricas significativas. O método proposto apresentou ainda um bom desempenho analítico, com limites de detecção e quantificação na faixa de milimolar, o que permitiu a determinação de íons Ni(II) em amostras fortificadas de bioetanol combustível e água residuária de maneira efetiva, com percentuais de recuperação satisfatórios e sem interferências de matriz.

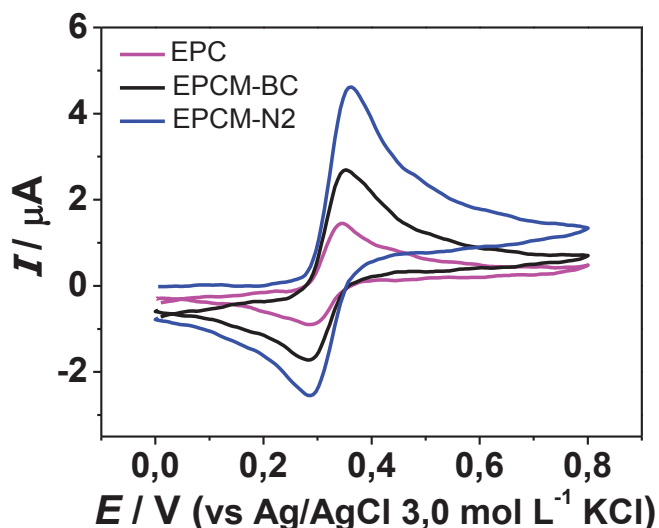
4.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO EM AMOSTRAS DE VINHO



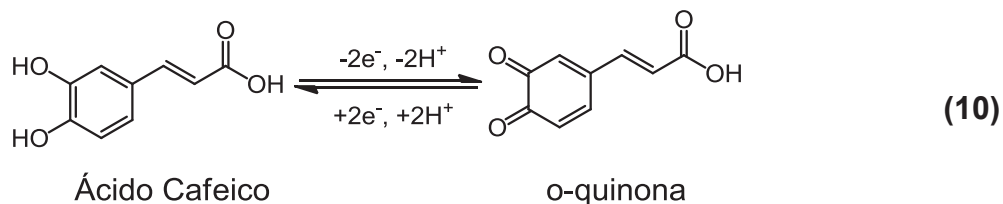
4.3.1 Comportamento Eletroquímico do EPCM-N2

A avaliação da potencialidade analítica do EPCM-N2 foi realizada após a pré-concentração espontânea de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafeico em solução de tampão fosfato pH 4,0. As medidas foram realizadas em solução de tampão fosfato pH 5,0. A FIGURA 39 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos de 0,0 V a 0,8 V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , para o eletrodo proposto (EPCM-N2), em comparação a um eletrodo não modificado (EPC) e um eletrodo modificado com biochar precursor (EPCM-BC).

FIGURA 39 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS COM OS ELETRODOS EPC (—), EPCM-BC (—) E EPCM-N2 (—) APÓS PRÉ-CONCENTRAÇÃO NA PRESENÇA DE $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DE ÁCIDO CAFEICO. v : 50 mV s^{-1}



Pelos resultados apresentados na Figura 39 foi possível verificar a capacidade de pré-concentração do analito sobre os três eletrodos avaliados, evidenciada pelos voltamogramas obtidos com boa definição dos sinais faradaicos. Os processos redox são relacionados à oxidação do ácido cafeico para a sua orto-quinona respectiva (ácido acrílico (2E)-3-(3,4-dioxociclohexa-1,5-dienil)), que ocorre em uma reação reversível, envolvendo 2 prótons e 2 elétrons [296], conforme apresentado a seguir na Reação (10). Estes processos foram observadas em potenciais de pico em torno de 0,36 V para a oxidação e 0,29 V para redução, em relação a um eletrodo de referência Ag/AgCl KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$.



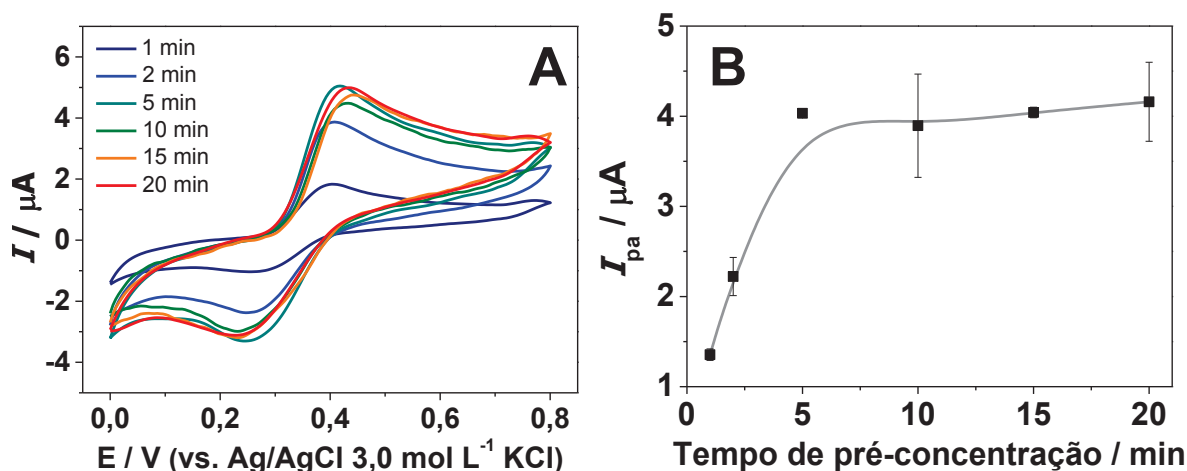
Variações em relação às intensidades dos sinais de resposta foram observadas para cada eletrodo, segundo a ordem: EPC < EPCM-BC < EPCM-N2. Este comportamento foi similar aos resultados observados anteriormente para a pré-concentração de outras espécies orgânicas (pesticidas), conforme apresentado na seção 4.1.9. Neste caso, o eletrodo modificado com biochar ativado apresentou os melhores resultados, com maior intensidade de sinais (I_{pa} e I_{pc}), de aproximadamente 3,0 e 1,5 vezes superior em comparação aos eletrodos EPC e EPCM-BC, respectivamente. A melhora dos sinais associado ao EPCM-N2 tem relação com a maior interação que o biochar possui com o ácido cafeico. Isto também está relacionada com a maior quantidade de grupos funcionais presentes na superfície do biochar quando comparados ao eletrodo contendo apenas grafite (EPC).

As interações que ocorrem entre o ácido cafeico e a superfície do biochar podem ocorrer de diversas maneiras, não somente devido à presença de grupos funcionais neste material, mas também por interações do tipo π - π que acontecem entre o anel aromático do ácido cafeico e do biochar (interações hidrofóbicas) [297-299]. Além disso, levando em conta que o biochar é um material altamente adsorvente, pode ocorrer concomitantemente a adsorção física (fisiossorção) do analito nos poros e/ou cavidades do biochar. Esta adsorção ocorre por meio de ligações mais fracas e que podem ser reversíveis [300]. Em virtude da melhor definição e magnitude de sinal, o processo anódico (oxidação) foi escolhido para monitorar a presença do ácido cafeico nos estudos subsequentes.

4.3.2 Otimização dos Parâmetros Experimentais para a Determinação de Ácido Cafeico

A fim de avaliar o tempo suficiente para uma eficiente pré-concentração do ácido cafeico à superfície do biochar, foi avaliada a influência do tempo de imersão do eletrodo com a solução de pré-concentração, realizada em tampão fosfato pH 4,0 contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafeico. As medidas foram realizadas por voltametria cíclica, após a pré-concentração em tempos que variaram de 1,0 a 20 minutos ($n=3$). Os resultados obtidos em função da intensidade de corrente (I_{pa}) são apresentados na FIGURA 40.

FIGURA 40 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS (A) E CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA ($N=3$) PARA O ÁCIDO CAFEICO E A VARIAÇÃO DO TEMPO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (B)

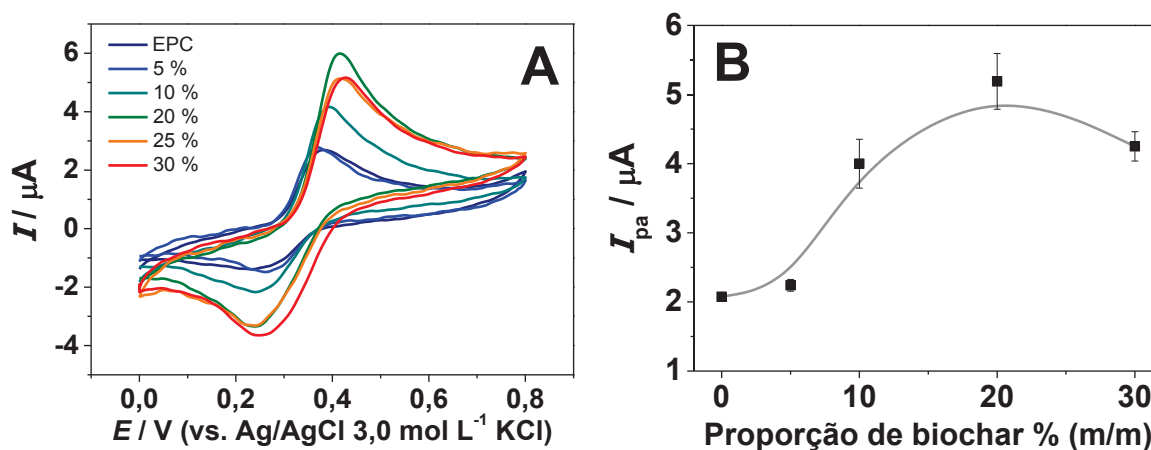


Com base na correlação obtida, foi possível observar um aumento dos sinais de resposta do ácido cafeico com o aumento do tempo de pré-concentração do analito, até 5,0 minutos. Isso foi devido ao maior tempo de contato existente entre o eletrodo e a solução contendo o ácido cafeico, permitindo que mais espécies pudessem ser pré-concentradas na superfície do EPCM-N2. Após 5,0 minutos de pré-concentração, não foram verificadas variações significativas na intensidade de corrente. Esse comportamento pode ser explicado pela saturação dos sítios ativos do biochar, e que não estão mais disponíveis para interação com o ácido cafeico após esse período de tempo,

alcançando-se uma condição de equilíbrio nesta concentração de analito avaliado.

O segundo parâmetro avaliado foi a quantidade de modificador (biochar) presente na pasta de carbono. Para essa análise, foram construídos seis eletrodos com diferentes quantidades de biochar em sua composição, na ausência de modificador (EPC) até 30 % (m/m), mantendo as demais condições constantes. A FIGURA 41 ilustra o desempenho do eletrodo em função das diferentes quantidades de biochar presentes na pasta de carbono.

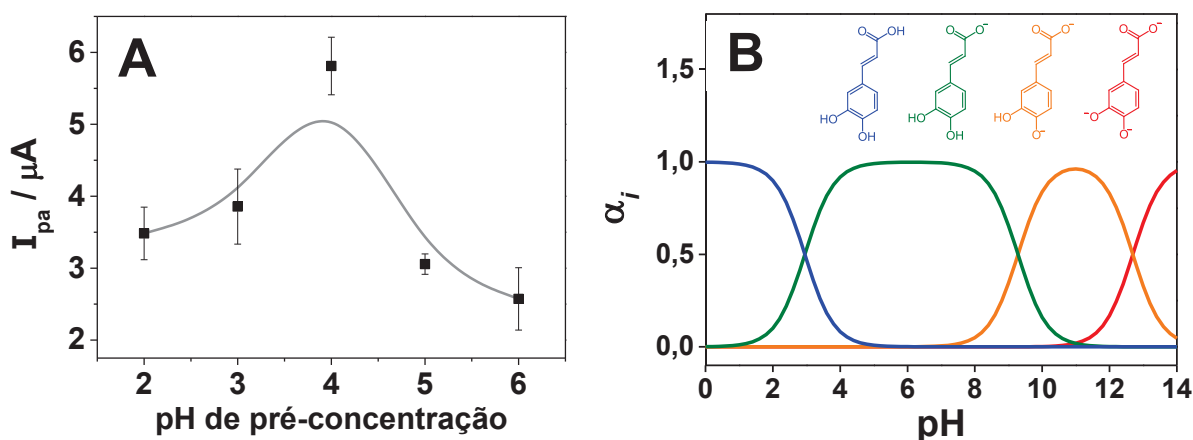
FIGURA 41 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS (A) E INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA (N=3) PARA O ÁCIDO CAFEICO COM A VARIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE BIOCHAR NA PASTA DE CARBONO (B)



Os resultados obtidos evidenciam que o aumento da quantidade do modificador no eletrodo proposto promoveu a melhora do sinal de resposta. O aumento da intensidade de sinal pode estar correlacionado com a maior quantidade de sítios funcionalizados e poros disponíveis para pré-concentrar o analito. O valor máximo de corrente é constatado com o EPCM confeccionado com 20 % (m/m) de biochar ativado, após isso é observada uma sutil diminuição dos valores de corrente de pico. O decaimento do sinal pode ser consequência da perda de condutividade do sensor, devido à diminuição do grafite (condutor) na pasta de carbono, para a adição de biochar, que não é um material condutor. Resultados semelhantes foram também observados em trabalhos anteriores que relatam o uso de biochar como modificador de eletrodos, sendo que os melhores resultados foram registrados com EPCM com proporções de biochar entre 15 e 25 % (m/m) [60, 301].

Em seguida, foram realizadas medidas para avaliar a influência do pH da solução de pré-concentração na resposta voltamétrica do ácido cafeico, mais precisamente na capacidade sortiva do eletrodo. A solução avaliada foi tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, utilizada para a pré-concentração do analito e para as medidas voltamétricas (eletrólito suporte). A seguir serão apresentados os resultados obtidos para a avaliação do pH da solução de pré-concentração, investigada de pH 2,0 a 6,0, conforme mostrado na FIGURA 42-A.

FIGURA 42 – CORRELAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICO OBTIDAS PARA O ÁCIDO CAFEICO EM FUNÇÃO DOS DIFERENTES VALORES DE pH DA SOLUÇÃO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (A). GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DO ÁCIDO CAFEICO (B)



Um aumento de sinal de resposta foi constatado para os valores de pH de 2,0 a 4,0, onde a intensidade de corrente atinge seu máximo. Acima de pH 4,0, ocorreu o decaimento dos sinais de resposta. Isso pode ser explicado com base no gráfico de distribuição de espécies obtida para o ácido cafeico (FIGURA 42-B). Em valores de pH abaixo de 4,0 há predominância da forma neutra da molécula. Já acima deste valor, ocorre a desprotonação do ácido cafeico com o surgimento de moléculas carregadas negativamente. Acredita-se que estas moléculas menos protonadas são menos atraídas pelo biochar, em decorrência da menor quantidade de ligações de hidrogênio disponíveis por molécula. Outro fator que pode contribuir para a maior ou menor interação entre biochar e ácido cafeico é o ponto isoelétrico do biochar tratado, que é em torno de 4,9. Ou seja, em pH inferior a 4,9 o biochar se encontra mais protonado, tendo mais afinidade com as moléculas carregadas negativamente. Em pH 4,0 aproximadamente 90 % das moléculas de ácido cafeico se encontram na forma desprotonada, com uma carga

negativa. Acima deste valor, a superfície do biochar está carregada negativamente, e o grupo carboxila ($-\text{COOH}$) do ácido cafeico apresenta propriedades aniônicas, praticamente 100 % carregado negativamente [302]. Logo, para valores de pH a partir de 5,0 haverá menor afinidade eletrostática entre a superfície do biochar e o ácido cafeico. Assim, a solução de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com valor de pH ajustado em 4,0 foi a escolhida por ter apresentado o melhor desempenho para a pré-concentração de ácido cafeico.

Após a otimização dos parâmetros experimentais, foram obtidas as condições de compromisso para a determinação de ácido cafeico, conforme apresentado na TABELA 16.

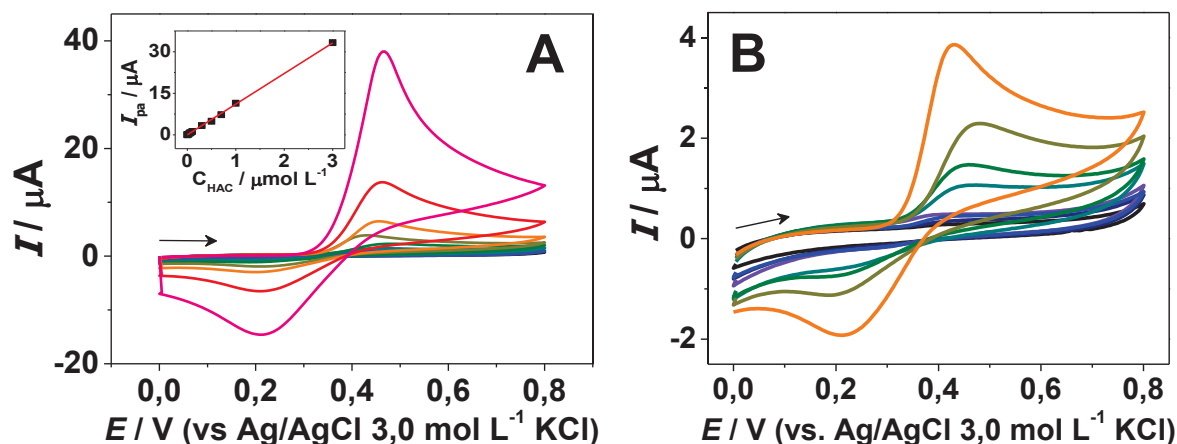
TABELA 16 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO

| Parâmetro | Condições de Compromisso |
|------------------------------|---|
| Tempo de pré-concentração | 5,0 min |
| Proporção de biochar no EPCM | 20 % (m/m) |
| Solução de pré-concentração | Tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 |
| Eletrólito suporte | Tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 |
| Velocidade de varredura | 75 mV s^{-1} |

4.3.3 Desempenho Analítico do EPCM-N2

O desempenho analítico do EPCM-N2 para a determinação de ácido cafeico, nas condições de compromisso determinadas, foi verificado pelas medidas em diferentes concentrações que variaram de $1,0 \times 10^{-6}$ a $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A FIGURA 43-A mostra os voltamogramas cíclicos obtidos na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e a curva analítica respectiva. Na FIGURA 43-B é possível observar a ampliação dos voltamogramas obtidos na região de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

FIGURA 43 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E CURVA ANALÍTICA OBTIDOS DE $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ A $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ DE ÁCIDO CAFEICO (A). AMPLIAÇÃO DE $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ A $0,30 \text{ mmol L}^{-1}$ (B). $v = 75 \text{ mV s}^{-1}$



A curva analítica obtida mostrou uma correlação linear ($R^2 = 0,9998$) na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com sensibilidade de $11,0 \mu\text{AL mmol}^{-1}$, com base na seguinte equação que rege esta correlação: $I (\mu\text{A}) = 11,06 C_{\text{HAC}} (\text{mmol L}^{-1}) + 0,0270$. Empregando as Equações (2) e (3), descritas na seção 4.2.3, foram obtidos os limites de detecção e de quantificação de $30,9$ e 103 nmol L^{-1} , respectivamente.

O desempenho analítico do EPCM-N2 mostrou-se comparável com outros trabalhos relatados na literatura para a determinação de ácido cafeico, conforme pode ser visualizado na TABELA 17. É possível destacar que o método utilizado no presente trabalho, utilizou-se de técnicas e procedimentos mais simples, desde a confecção do eletrodo. Explorando a capacidade sortiva do biochar, foi possível utilizar uma técnica de redissolução (*stripping*), e realizar a pré-concentração espontânea da espécie orgânica. Além disso, utilizando uma técnica voltamétrica menos sensível, como a voltametria cíclica, o EPCM-N2 apresentou uma ampla região linear de trabalho, além de elevadas sensibilidade e detectabilidade, comparáveis com os demais trabalhos.

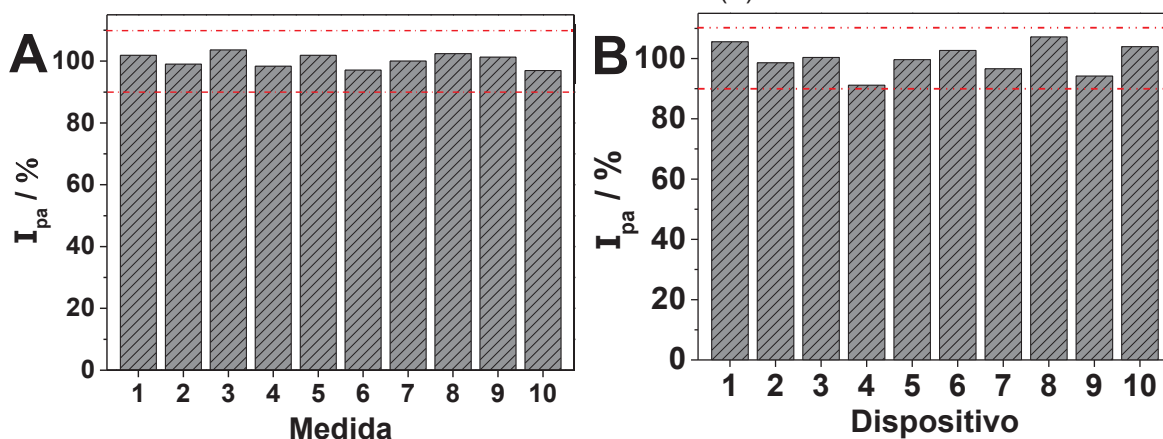
TABELA 17 – DESEMPENHO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ÁCIDO CAFEICO EM AMOSTRAS DE VINHO

| Amostra | Eletrodo | Técnica | LDR ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | b ($\mu\text{A L mmol}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Ref. |
|-----------------------------|----------------------|-----------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Vinhos branco, rose e tinto | EPCM-N2 | CV | 1,0–3000 | 11,06 | 0,031 | <i>Este trabalho</i> |
| Vinho branco | SPE-IrC | CV | 0,0–139 | 19,2 | ^a | [303] |
| Vinhos branco, rose e tinto | GCE-Laccase | FIA | 0,0056–0,56 | ^a | 0,004 | [304] |
| Vinhos branco e tinto | CPME-Fc-CNT | Amp. | 0,33–383 | 0,98 | 0,11 | [305] |
| Vinho branco | GCE-CNT | Amp. | 9,2–160 | 0,081 | 2,80 | [306] |
| Vinho tinto | GCE-PG | LV SWV | a = 9,0–40 b = 4,0–30 | a = 0,283 b = 1,08 | a = 3,91 b = 1,25 | [307] |
| Vinho tinto | NDC/GCE | DPV | 0,01–350 | 20,9 | 0,0024 | [308] |
| Vinho tinto | RGO@PDA | CV DPV | a = 50–300 b = 0,005–450 | a = 2,35 b = 0,13 | 0,0012 | [309] |
| Vinho tinto | GCE-MoS ₂ | DPV | a = 0,2–110,5 b = 110,5–482 | a = 1,13 b = 0,28 | 0,76 | [310] |

b: Sensibilidade. ^a: Dados não fornecidos. SPE-IrC: Eletrodo impresso com irídio e carbono. GCE-Laccase: Eletrodo de carbono de vidro com enzima lacase. CPME-Fc-CNT: Eletrodo de pasta de carbono modificado com ferroceno e nanotubos de carbono. GCE-CNT: Eletrodo de carbono de vidro com nanotubos de carbono. GCE-PG: Eletrodo de carbono vítreo modificado com poli (ácido glutâmico). NDC/GCE: Eletrodo de carbono vítreo modificado com carbono dopado com nitrogênio. RGO@PDA: Eletrodo de carbono vítreo modificado composto de óxido de grafeno e polidopamina reduzido. GCE-MoS₂: Eletrodo de carbono de vidro com nanotubos de MoS₂ e PANI. LV: voltametria linear.

Em seguida, estudos para avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade do eletrodo proposto (FIGURA 44) foram conduzidos mediante medidas consecutivas realizadas na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafeico, nas mesmas condições usadas na obtenção da curva analítica. Os valores de intensidade de corrente de pico relativa obtidos para cada medida foram comparados à média de todas as medidas ($I_{pa} = 7,51 \mu\text{A}$), onde foi observado que as medidas não apresentaram diferenças significativas entre si. Os eletrodos construídos apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade, com RSD de $\pm 2,31$ e $\pm 5,06$ %, respectivamente.

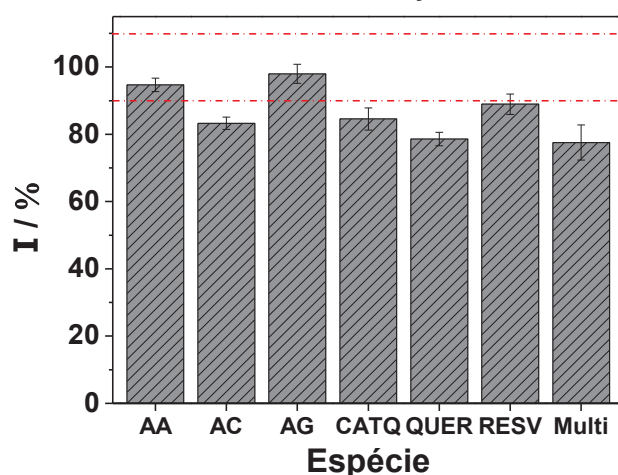
FIGURA 44 – VALORES DE CORRENTE RELATIVA OBTIDOS PARA MEDIDAS CONSECUTIVAS DE ÁCIDO CAFEICO PARA AVALIAR A REPETIBILIDADE (A) E A REPRODUTIBILIDADE (B)



4.3.4 Efeito de Espécies Concomitantes

Com o intuito de realizar a determinação de ácido cafeico em amostras de vinho, o estudo de possíveis interferências foi realizado na presença de algumas espécies em concentrações médias tipicamente encontradas nesta matriz [240, 241]. As concentrações e as espécies avaliadas foram as seguintes: $2,84 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido ascórbico (AA), $5,64 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de ácido clorogênico (AC), $1,47 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido gálico (AG), $5,16 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de catequina (CATQ), $8,27 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de quercetina (QUER) e $8,75 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de resveratrol (RESV). A concentração média de ácido cafeico encontrada em amostras de vinho e avaliada neste estudo foi de $1,10 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A FIGURA 45 apresenta os resultados obtidos em função das correntes relativas (I_{pa}) registradas.

FIGURA 45 – CORRENTES DE PICO RELATIVAS OBTIDAS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES CONCOMITANTES PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO



Com os resultados obtidos, foi possível observar que a maioria das espécies avaliadas ocasionou em variações no sinal de resposta do ácido cafeico, principalmente em relação à diminuição do sinal. A maior interferência foi observada quando na presença da solução multielementar (Multi), contendo todas as espécies concomitantes, que apresentou interferência de -21 %. Estas interferências podem estar relacionadas com a interação que o biochar apresenta com os outros compostos fenólicos avaliados. Estas espécies apresentam estruturas moleculares semelhantes e, conseqüentemente, podem apresentar afinidade com o biochar. Desta maneira, quanto mais espécies presentes em solução, maior poderá ser a concorrência e interferência com ácido cafeico. No entanto, uma forma de contornar estas possíveis interferências é a realização da determinação de ácido cafeico em amostra de vinhos por adição de padrão.

4.3.5 Determinação de Ácido Cafeico em Amostras de Vinho

A eficiência do método proposto foi avaliada na determinação do ácido cafeico em amostras reais de vinhos branco, rosé e tinto. Contudo, visando contornar possível interferência de matriz, o método de adição de padrão foi também utilizado nesta determinação. Assim, as amostras foram enriquecidas com ácido cafeico em três níveis de concentração, de 5,0; 10 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Comparativamente, foram também realizadas medidas para os três tipos de vinho, empregando o método espectroscópico de Folin-Ciocalteu, visando a validação do método voltamétrico proposto (TABELA 18).

Os vinhos apresentam concentrações variáveis de compostos fenólicos, tal como o ácido cafeico, e que podem ser alteradas devido ao tipo de uva utilizada no processo de fermentação, por exemplo, além de condições ambientais e de armazenamento [240]. Assim, comparando os resultados obtidos, o vinho branco apresentou concentrações mais baixas de compostos fenólicos, e no vinho tinto foram determinadas concentrações superiores aos outros tipos de vinho avaliados, o que já era esperado.

TABELA 18 – CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO CAFEICO ENCONTRADO EM AMOSTRAS DE DIFERENTES VINHOS, PELOS MÉTODOS DE FOLIN-CIOCALTEU E VOLTAMÉTRICO, E VALORES DE RECUPERAÇÃO PARA AMOSTRAS FORTIFICADAS (N = 3)

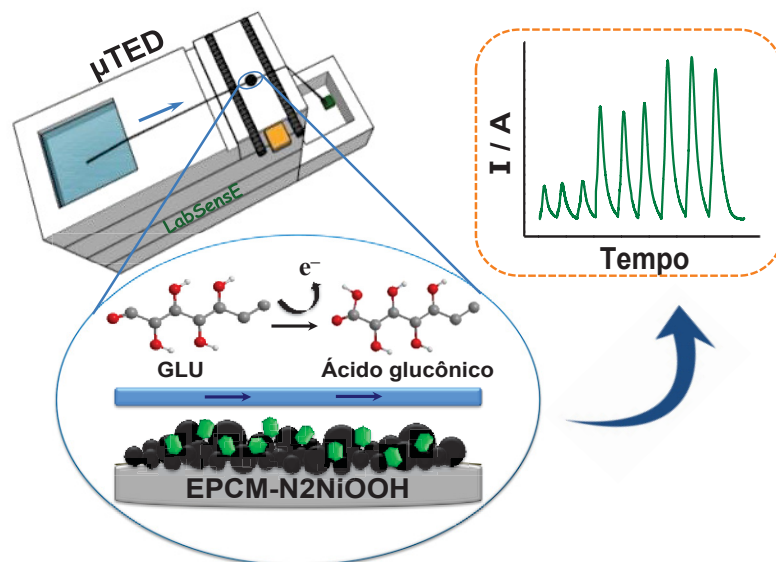
| Amostra | Encontrado (mol L ⁻¹) | | Adicionado (mol L ⁻¹) | Recuperado (%) |
|--------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|----------------|
| | Folin-Ciocalteu | Voltamétrico | | |
| Vinho Branco | 1,79 x 10 ⁻³ | 1,67 x 10 ⁻⁵ ± 6,39 x 10 ⁻⁷ | 5,00 x 10 ⁻⁶ | 116 |
| | | | 1,00 x 10 ⁻⁵ | 107 |
| | | | 1,50 x 10 ⁻⁵ | 105,3 |
| Vinho Rose | 2,74 x 10 ⁻³ | 2,54 x 10 ⁻⁵ ± 3,77 x 10 ⁻⁶ | 5,00 x 10 ⁻⁶ | 108 |
| | | | 1,00 x 10 ⁻⁵ | 90,6 |
| | | | 1,50 x 10 ⁻⁵ | 91,9 |
| Vinho Tinto | 1,80 x 10 ⁻² | 1,56 x 10 ⁻⁴ ± 6,52 x 10 ⁻⁶ | 5,00 x 10 ⁻⁶ | 99,2 |
| | | | 1,00 x 10 ⁻⁵ | 108 |
| | | | 1,50 x 10 ⁻⁵ | 118 |

O método proposto também apresentou valores concordantes com método comparativo de Folin-Ciocalteu, e as concentrações determinadas para ambos os métodos foram proporcionais entre os tipos de vinho avaliados, demonstrando que o método proposto é comparável ao método espectroscópico. As concentrações determinadas pelos dois métodos foram utilizadas para calcular as razões entre os tipos de vinho, sendo obtidos os seguintes valores: 1,5 para os vinhos rose e branco; 6,5 para tinto e rose; e 10 para tinto e branco. É importante ressaltar que o método de Folin-Ciocalteu considera o teor total de polifenóis, e não apenas a presença do ácido cafeico. No entanto, utilizando a determinação voltamétrica e as relações mencionadas acima, foi possível prever o teor de compostos fenólicos presentes nas diferentes amostras de vinho. Para as amostras de vinho enriquecidas, o método voltamétrico também apresentou valores satisfatórios de recuperação de 90,6 a 118 % para os três níveis de concentração avaliados. Isso demonstra que o método proposto foi eficiente na determinação de ácido cafeico em amostras reais e fortificadas.

4.3.6 Conclusões Parciais para a Determinação de Ácido Cafeico

Com os resultados obtidos neste capítulo, foi possível constatar a potencialidade analítica do EPCM-N2 também para a pré-concentração espontânea e determinação de um composto orgânico, o ácido cafeico. O dispositivo apresentou resultados superiores em comparação a um EPC e EPCM-BC, demonstrando que para esta estratégia a ativação do biochar também corroborou para a melhora dos sinais de resposta para o ácido cafeico. Uma ampla faixa de região de trabalho foi obtida, com elevadas sensibilidade, detectabilidade e reprodutibilidade, o que evidencia o uso do sensor proposto. Além disso, o método mostrou-se comparável ao método espectroscópico (Folin-Ciocalteu), apresentando relações similares para a determinação de ácido cafeico em três amostras reais de vinhos distintos (branco, rosé e tinto). Isso sugere que a estimativa de compostos fenólicos totais poderia ser realizada em função da determinação voltamétrica do ácido cafeico. Além disso, o método apresentou boa recuperação para as determinações após a fortificação das amostras de vinho.

4.4 DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE UTILIZANDO NiOOH SUPORTADO EM BIOCHAR ATIVADO EM UM DISPOSITIVO μ TED

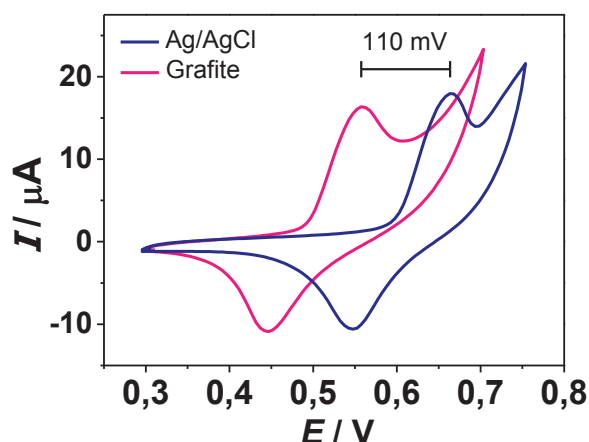


4.4.1 Comportamento Eletroquímico do EPCM-NiN2 Acoplado ao μ TED

Na seção 4.2 foi verificada a potencialidade do EPCM com biochar ativado em pré-concentrar íons Ni(II), e posteriormente em quantificar o analito monitorando o par redox Ni(II)/Ni(III), pela formação de NiOOH em meio básico. Partindo desta premissa, para esta estratégia o EPCM-N2, contendo NiOOH como mediador redox, foi empregado como um sensor não-enzimático (EPCM-N2Ni) para a determinação de glicose. O sistema de detecção utilizado nesta etapa foi um sistema microfluídico baseado em fios têxteis (μ TED).

O ancoramento da espécie electrocatalítica (NiOOH) foi realizada de maneira semelhante ao apresentado anteriormente, pela pré-concentração e síntese. Inicialmente, o comportamento voltamétrico do eletrodo proposto foi verificado empregando dois arranjos de eletrodos distintos, constituídos por um contra-eletrodo de grafite cilíndrico ($\varnothing = 2,0$ mm) e o EPCM-N2 como eletrodo de trabalho. Quanto ao eletrodo de referência, o primeiro arranjo foi composto por um eletrodo de Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹, e o segundo por um pseudo-eletrodo de referência de grafite cilíndrico (mesmo empregado como contra-eletrodo). Desta forma, os dois arranjos de eletrodos foram avaliados, e a FIGURA 46 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em função da diferença entre os potenciais desenvolvidos por ambos os eletrodos, em solução de KOH 0,01 mol L⁻¹.

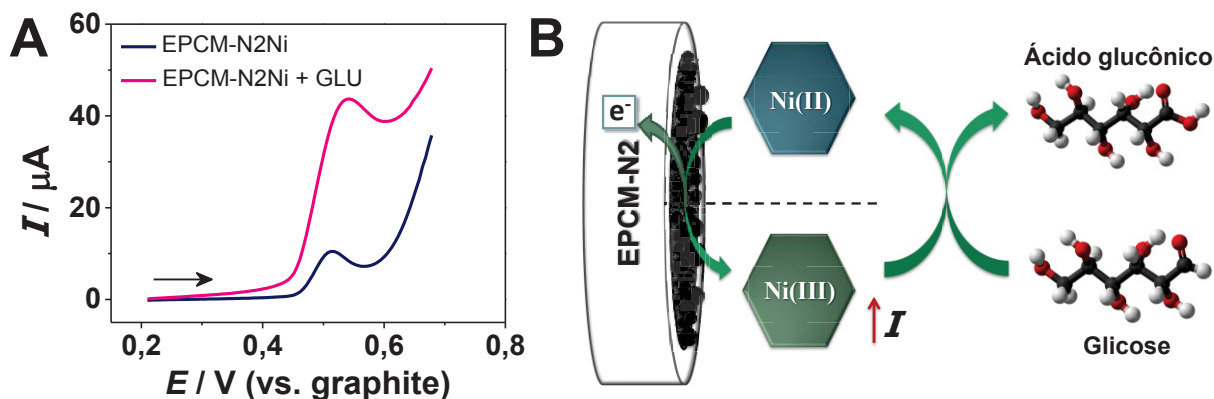
FIGURA 46 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS COM OS ELETRODOS DE REFERÊNCIA DE Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹ (—) E GRAFITE CILÍNDRICO (—). v : 50 mV s⁻¹



Observou-se que ambos os arranjos de eletrodos apresentaram um comportamento voltamétrico muito semelhante referentes ao par redox Ni(II)/Ni(III). Isso indica que a diferença do tipo de eletrodo utilizado (eletrodo auxiliar e referência) não altera o comportamento voltamétrico, uma vez que se utilizou o mesmo eletrodo de trabalho em ambos os arranjos. A única diferença observada foi o deslocamento dos potenciais de pico para potenciais menos positivos, de aproximadamente 110 mV, utilizando o eletrodo de referência de grafite. Neste caso, o eletrodo de grafite se comporta como um pseudo-eletrodo de referência, e não apresenta um potencial eletrodo/solução constante, diferentemente do eletrodo de Ag/AgCl com KCl 3,0 mol L⁻¹, que apresenta um sistema fechado, contendo uma solução interna com concentração constante. Como um pseudo-eletrodo de referência não apresenta esta configuração, pode ser suscetível às variações de potencial dependentes da solução externa [311]. Contudo, isto não impede a utilização do grafite como eletrodo de referência, pelo fato da natureza físico-química do eletrodo de trabalho não ser alterada com o emprego de diferentes eletrodos de referência. Assim, a configuração envolvendo o pseudo-eletrodo de referência de grafite foi a escolhida para compor o sistema de detecção do dispositivo μ TED.

A seguir, para verificar a influência do efeito catalítico do níquel para a reação de oxidação da glicose, medidas de voltametria cíclica foram realizadas empregando o EPCM-N2Ni acoplado ao dispositivo μ TED, na ausência e na presença de 0,10 mmol L⁻¹ de glicose (FIGURA 47-A).

FIGURA 47 – VOLTAMOGRAMAS OBTIDOS COM O EPCM-N2Ni NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE 0,10 mmol L⁻¹ DE GLICOSE (A). ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS REAÇÕES QUE OCORREM APÓS A ADIÇÃO DE GLICOSE (B)



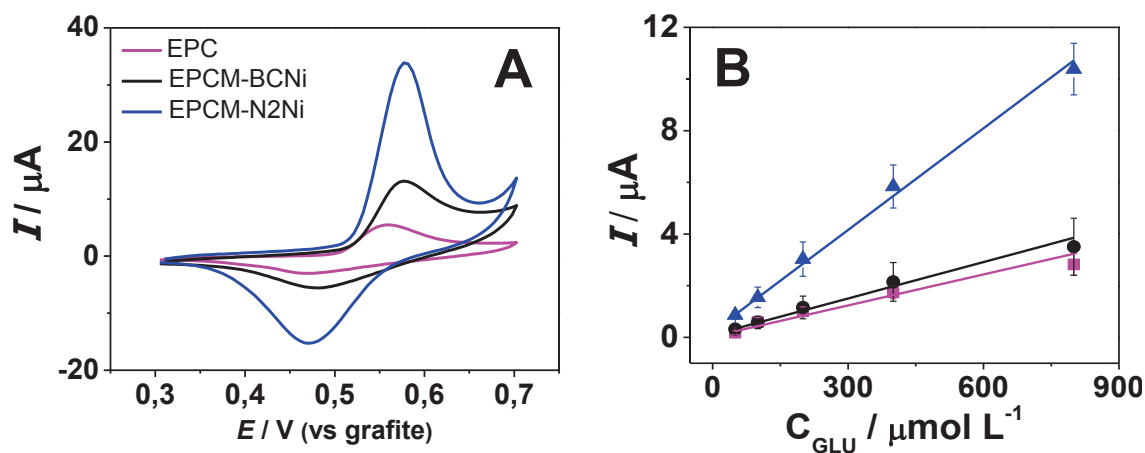
Após a injeção de glicose, foi observado o aumento do sinal de oxidação, para formação de NiOOH. Isto pode ser atribuído ao efeito catalítico do par redox Ni(OH)₂/NiOOH para a oxidação da glicose, seguindo a Reação (11).



O esquema representado na FIGURA 47-B, ilustra a reação de oxidação da glicose catalisada pela presença de NiOOH na superfície do eletrodo, em que o níquel apresenta estado de oxidação +3 e é altamente reativo com a glicose. Após a reação de oxidação da glicose, o NiOOH é regenerado a Ni(OH)₂ (Ni(II)). Contudo, o potencial aplicado sob o eletrodo ainda se apresenta positivo o suficiente para converter, novamente, o Ni(OH)₂ em NiOOH, esta espécie reage novamente com a glicose, promovendo um ciclo reacional, que levou ao aumento significativo da corrente de oxidação Ni(II)/Ni(III). Paralelo a isso, ocorreu a diminuição da intensidade de corrente do pico de redução, relacionado ao consumo de espécies de NiOOH durante a catálise de glicose, uma vez que há menos espécies de NiOOH para serem reduzidas a Ni(OH)₂ [89].

O comportamento eletroquímico do eletrodo proposto EPCM-N2Ni foi comparado a um eletrodo não modificado (EPC) e um EPCM com biochar precursor (EPCM-BCNi), em que todos foram submetidos ao mesmo procedimento de formação do NiOOH. Após a pré-concentração de íons Ni(II), foram obtidos os voltamogramas cíclicos para os três eletrodos de trabalho (FIGURA 48-A). Em seguida, conforme mostrado na FIGURA 48-B, foram obtidas as curvas analíticas empregando a técnica de amperometria, com injeções de glicose em concentrações de 50 a 800 μmol L⁻¹ (n=3), e potencial aplicado de 0,60 V, para cada eletrodo de trabalho acoplado ao dispositivo μTED.

FIGURA 48 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O PAR Ni(II)/Ni(III) (A) E CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS POR AMPEROMETRIA (n=3) (B) EMPREGANDO OS ELETRODOS EPC, EPCM-BCNi E EPCM-N2Ni. ADIÇÕES DE GLICOSE: 50 A 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$. POTENCIAL APLICADO: 0,60 V



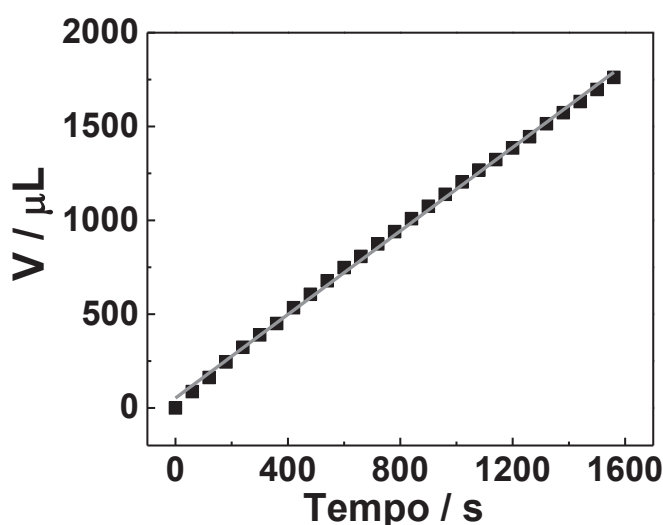
Com este estudo foi possível observar que os três eletrodos apresentaram sinais faradáicos para o par redox Ni(II)/Ni(III), com variações em relação as intensidades dos sinais. Sendo que o eletrodo modificado com biochar ativado apresentou os sinais faradáicos com maior intensidade de corrente, seguido pelo eletrodo modificado com biochar não ativado, e por fim, o eletrodo de pasta de carbono não modificado. Assumindo que a maior intensidade de corrente é em decorrência da maior quantidade de NiOOH formado na superfície do eletrodo, os resultados sugerem a maior eficiência do EPCM-N2Ni na formação do NiOOH.

Paralelo a isso, observando as curvas analíticas obtidas pelas adições de glicose (FIGURA 48-B), nota-se uma tendência em relação à resposta linear (sensibilidade) de cada eletrodo e as respectivas intensidades de correntes de oxidação (NiOOH), observadas na FIGURA 48-A. Sendo que os eletrodos EPC e EPCM-BCNi apresentaram sensibilidades menores, de 4,0 ($R^2 = 0,942$) e 4,7 $\mu\text{AL } \mu\text{mol}^{-1}$ ($R^2 = 0,981$), respectivamente, em comparação ao EPCM-N2Ni. O eletrodo proposto apresentou o melhor desempenho analítico, com melhor linearidade ($R^2 = 0,996$) e sensibilidade de 13,1 $\mu\text{AL } \mu\text{mol}^{-1}$. A melhor sensibilidade obtida para este eletrodo pode ser atribuída a maior quantidade de NiOOH presente superficialmente. Esta maior quantidade de níquel pode ser relacionada a maior quantidade de sítios disponíveis para a pré-concentração presentes no biochar ativado. Isso demonstra que o dispositivo apresentou potencialidade analítica para a determinação não-enzimática de glicose.

4.4.2 Otimização dos Parâmetros Experimentais para Determinação de Glicose

Inicialmente foi avaliada a vazão do dispositivo μ TED, a partir da pesagem do reservatório de saída em função do tempo. Os valores de massa foram convertidos em volume, sendo possível obter os resultados apresentados na FIGURA 49.

FIGURA 49 – AVALIAÇÃO DA VAZÃO DO SISTEMA μ TED CONTENDO O EPCM-N2Ni, REALIZADA DE 0 A 30 MINUTOS



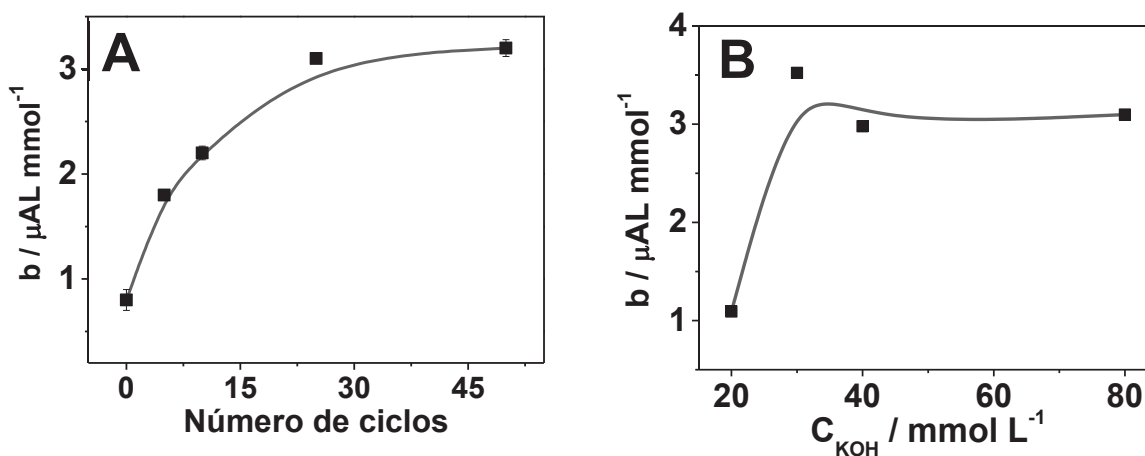
A FIGURA 49 apresenta a relação linear ($R^2 = 0,9998$) obtida entre os volumes registrados e o tempo, de 0 a 30 minutos. A elevada linearidade indica que o sistema apresentou uma vazão constante, ou seja, de forma confiável e precisa mesmo após 30 minutos. A partir do coeficiente angular da relação entre volume e tempo foi obtida a vazão do dispositivo μ TED de $1,11 \mu\text{L s}^{-1}$. Este valor mostrou-se comparável com outras vazões relatadas na literatura para sistemas microfluídicos [122, 312].

Alguns parâmetros experimentais relacionados ao par redox Ni(II)/Ni(III) avaliados e otimizados anteriormente para a determinação direta de níquel foram também utilizados para esta estratégia, sendo estes: solução de KOH como eletrólito suporte (solução transportadora); potencial e tempo de condicionamento de 0,70 V e 90 s, respectivamente; e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Para a determinação de glicose, foram avaliadas as condições relacionadas ao sistema de detecção e ao funcionamento do dispositivo μ TED. Para cada parâmetro foram realizadas medidas amperométricas aplicando potencial fixo de 0,60 mV, injeções de 0,5 a 5,0 mmol L⁻¹ de glicose e volume de injeção de 2,0 μ L. A melhor condição, ou condição de compromisso, foi determinada pela maior inclinação da curva de correlação entre I e C_{GLU} .

Primeiramente, foi estudada a influência do número de ciclos na formação do par redox Ni(II)/Ni(III), por voltametria cíclica. Foram avaliados os valores de 0 a 50 ciclos, após a pré-concentração de 50 mmol L⁻¹ de íons Ni(II). Na FIGURA 50-A é mostrada a correlação entre a sensibilidade (b) e o número de ciclos. Observou-se que com o aumento do número de ciclos ocorreu o aumento da sensibilidade, até 25 ciclos. Depois disso, não foi observada diferença significativa no valor de sensibilidade. Este comportamento também pode ser correlacionado à maior quantidade de NiOOH formada na superfície do eletrodo. Os maiores valores de sensibilidade foram obtidos para 25 e 50 ciclos, não havendo diferença significativa entre ambos os valores de sensibilidade. Isso sugere que a sensibilidade não é mais limitada pelo número de ciclos após o valor de 25 ciclos, sendo este valor suficiente para a formação de NiOOH e estabilização do eletrodo, e este foi o valor escolhido para este parâmetro avaliado.

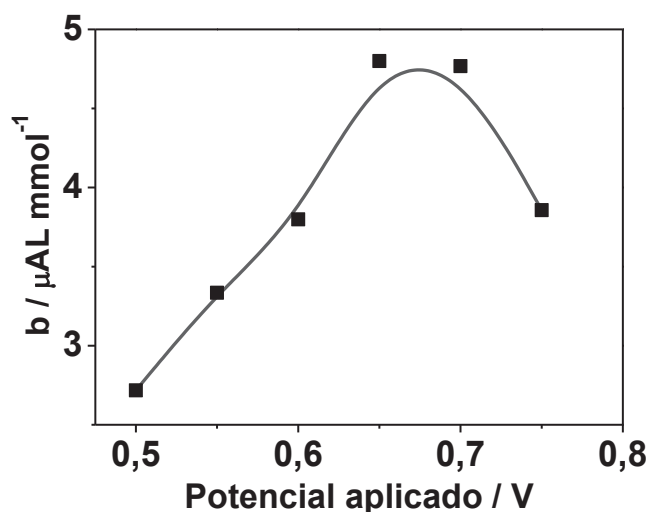
FIGURA 50 – CORRELAÇÃO ENTRE A SENSIBILIDADE (N=3) OBTIDA NA PRESENÇA DE GLICOSE COM A VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CICLOS PARA A FORMAÇÃO DE NiOOH (A) E DA CONCENTRAÇÃO DE KOH (ELETRÓLITO SUPORTE) (B)



Em seguida, foi verificada a influência da concentração da solução transportadora (eletrólito suporte), foram avaliadas as concentrações de 20 a 80 mmol L⁻¹ de KOH. A FIGURA 50-B apresenta o aumento da sensibilidade de 20 a 30 mmol L⁻¹ de KOH, sendo que o aumento da concentração de íons OH⁻ favorece a formação de NiOOH. A concentração de KOH de 30 mmol L⁻¹ foi escolhida devido à melhor resposta observada. Acima desta concentração foi observada a estabilização da sensibilidade. Além disso, com o aumento da concentração de KOH, nenhuma variação foi observada nos sinais faradáicos para o par redox Ni(II)/Ni(III), sugerindo a saturação da superfície do biochar pela formação de espécies de níquel.

Após a avaliação do eletrólito suporte, foi investigado o efeito do potencial aplicado para as medidas amperométricas na presença de glicose. Foram escolhidos os valores de potencial que variaram de 0,50 a 0,75 V, considerando o potencial de pico (E_{pa} vs. Grafite) da reação de oxidação Ni(II)/Ni(III). Os resultados são mostrados na FIGURA 51.

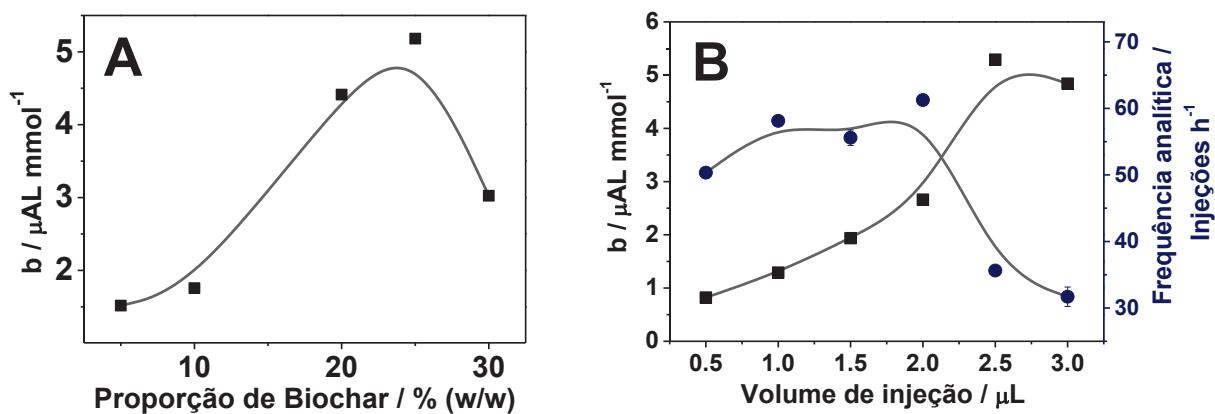
FIGURA 51 – CORRELAÇÃO ENTRE A SENSIBILIDADE (N=3) OBTIDA NA PRESENÇA DE GLICOSE COM A VARIAÇÃO DO POTENCIAL APLICADO NAS MEDIDAS AMPEROMÉTRICAS (B)



De acordo com os resultados da FIGURA 51, foi observado o aumento da sensibilidade com o aumento do valor de potencial aplicado até 0,65 V. Isso está relacionado com a melhor taxa de conversão de Ni(II) em Ni(III), conseqüentemente, uma maior quantidade de elétrons está envolvida no ciclo electrocatalítico para oxidação da glicose e regeneração electroquímica de Ni(II) em Ni(III). Sendo assim, com a aplicação do potencial de 0,65 V tem-se a melhor condição de trabalho, escolhida para os estudos posteriores. Acima deste valor, para o potencial de 0,75 V, observou-se a diminuição da sensibilidade, que pode estar relacionada com alguma possível alteração da estrutura do eletrodo de trabalho, tanto da pasta de carbono quanto do modificador, em decorrência do potencial elevado, como também observado para a avaliação do potencial de condicionamento realizada na seção 4.2. Outro fator que inviabilizou a utilização de potenciais acima de 0,65 V, foi o alargamento dos sinais transientes, que não é interessante para as determinações amperométricas devido ao maior tempo de análise e, conseqüentemente à diminuição da frequência analítica.

A fim de verificar a influência da composição da pasta de carbono sobre a resposta amperométrica para a glicose, eletrodos com diferentes proporções dos componentes da pasta de carbono foram preparados e avaliados. Foram avaliadas as proporções de biochar que variaram de 5,0 a 30 % (m/m). Cada eletrodo foi submetido à etapa de formação de NiOOH, e posteriores medidas amperométricas na presença de glicose. Os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 52-A.

FIGURA 52 – CORRELAÇÃO ENTRE A SENSIBILIDADE (N=3) OBTIDA NA PRESENÇA DE GLICOSE COM A VARIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE BIOCHAR NA PASTA DE CARBONO (A). CORRELAÇÃO ENTRE O VOLUME DE INJEÇÃO DE GLICOSE (■) E A FREQUÊNCIA ANALÍTICA (●) (B). INJEÇÃO DE GLICOSE: 0,5 A 5,0 mmol L⁻¹



Com o aumento da quantidade de biochar na pasta de carbono, foi observado o aumento do sinal de resposta da glicose até o valor de 25 % (m/m), o que pode ser atribuído ao aumento da quantidade de sítios disponíveis para a adsorção de íons Ni(II) na superfície do eletrodo. Com uma maior quantidade de NiOOH, após a etapa de síntese, a reação catalítica da glicose pode ser favorecida, conforme a maior magnitude de corrente observada. Acima deste valor, observa-se uma diminuição da sensibilidade, o que pode ser explicado pela substituição de grafite por biochar (um material não condutor) na pasta de carbono, e isso provavelmente comprometeu a capacidade de transferência eletrônica do eletrodo. Assim, a melhor resposta foi observada com o EPCM-N2Ni com composição de 25 % de óleo mineral, 50 % de grafite e 25 % de biochar.

Outro parâmetro avaliado, e que pode influenciar na resposta voltamétrica, foi o volume de injeção da solução de glicose no sistema microfluídico. Para isso, foram investigados diferentes volumes de injeção, de 0,5 a 3,0 μL , em concentrações de glicose de 0,5 a 5,0 mmol L^{-1} . A FIGURA 52-B mostra o aumento do sinal de resposta com o aumento do volume injetado, de 0,5 até 2,5 μL . Esse comportamento deve-se a menor dispersão da solução de glicose nos microcanais quando volumes maiores são injetados, em que a quantidade de glicose, que passa pelo detector é maior. No entanto, para maiores volumes de solução de glicose adicionadas, há um maior tempo de contato do analito com o detector, o que promoveu um alargamento dos sinais transientes [313]. Para o maior volume de injeção de 3,0 μL , também foram constatados problemas de vazamento da solução dos microcanais, o que ocasionou em uma ligeira diminuição da sensibilidade.

Em relação à frequência analítica do dispositivo μTED , observou-se uma diminuição deste fator para volumes de injeção acima de 2,0 μL , diretamente relacionado com a largura dos sinais de resposta. Sendo que com este volume obteve-se uma maior frequência analítica de 61 injeções por hora, o que está em concordância com outros dispositivos microfluídicos relatados na literatura [246, 314]. Com isso, o volume de injeção de 2,0 μL foi escolhido para os experimentos subsequentes.

A TABELA 19 relaciona todos os parâmetros experimentais avaliados com as condições otimizadas para determinação não-enzimática de glicose. As condições ótimas foram escolhidas de acordo com os melhores sinais de resposta, e também visando a melhor frequência analítica para as medidas amperométricas de determinação de glicose.

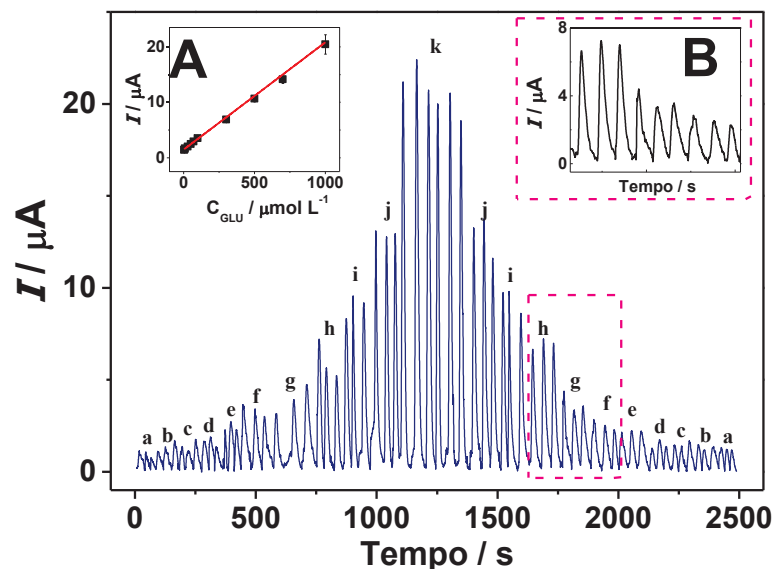
TABELA 19 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE

| Parâmetro | Condições de Compromisso |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Proporção de biochar | 25 % (m/m) |
| Tempo de pré-concentração íons Ni(II) | 5,0 segundos |
| Número de ciclos (Formação de NiOOH) | 25 ciclos |
| Potencial aplicado | 0,65 V |
| Eletrólito suporte | KOH 30 mmol L ⁻¹ |
| Volume de adição de glicose | 2,0 µL |
| Vazão | 1,11 µL s ⁻¹ |

4.4.3 Desempenho Analítico do EPCM-N2-Ni Acoplado ao µTED

Após a otimização dos parâmetros experimentais, foram realizadas medidas amperométricas para verificar o desempenho analítico do método proposto. Injeções de 2,0 µL de glicose foram realizadas na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (n=3), no sentido crescente e decrescente de concentração. Os amperogramas e as curvas analíticas respectivas às adições de glicose são apresentados na FIGURA 53. A curva analítica apresentou uma correlação linear ($R^2 = 0,995$) entre a concentração de glicose e o sinal de resposta em uma faixa de concentração de glicose, de $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹: $I (\mu A) = 19,4 C_{GLU} (\text{mmol L}^{-1}) + 1,46$. Além disso, não foi observado nenhum efeito de memória significativo ao se realizar a curva analítica, uma vez que as intensidades dos sinais transientes obtidos no sentido crescente foram equivalentes as intensidades dos sinais obtidos no sentido decrescente de concentração. Foram obtidos os valores de sensibilidade de 19,4 e 18,2 µAL mmol⁻¹ para as respectivas injeções.

FIGURA 53 – AMPEROGRAMAS OBTIDOS PARA INJEÇÕES DE GLICOSE ($n=3$) NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO $5,0 \times 10^{-6}$ A $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. INSERIDO: CURVA ANALÍTICA OBTIDA A PARTIR DE ADIÇÕES DE GLICOSE EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (A), E AUMENTO DOS SINAIS TRANSIENTES (B). ELETRÓLITO SUPORTE: KOH 30 mmol L⁻¹. VOLUME DE INJEÇÃO: 2,0 μ L



Os parâmetros obtidos com a curva analítica demonstraram que a etapa de limpeza dos microcanais, pela passagem do eletrólito suporte, foi efetiva e não foram verificados problemas de “envenenamento” pela constante passagem do analito. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados a partir da sensibilidade em função do desvio padrão do branco, conforme descrito anteriormente, utilizando as Equações (2) e (3). Assim, foram obtidos os valores de LOD de $1,37 \times 10^{-7}$ e LOQ de $4,58 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

O desempenho analítico do dispositivo proposto mostrou-se comparável a outros sensores não-enzimáticos baseados em níquel para a determinação de glicose, conforme sumarizado na TABELA 20. Nota-se que a LDR apresentada pelo método proposto neste trabalho é comparável ou superior que a região observada em outros trabalhos. Além disto, esta região compreende uma ampla faixa de concentração, de micro a milimolar. Levando em consideração que a glicose é determinada na faixa de milimolar em amostras de fluídos biológicos [206, 315], isso permite que a determinação de glicose possa ser realizada diretamente na amostra, ou pela diluição destas, visando a minimização de efeitos de matriz. Paralelo a isso, o LOD e a sensibilidade determinados também encontram-se compatíveis com outros relatos da literatura.

TABELA 20 – DESEMPENHO ANALÍTICO DE SENSORES NÃO-ENZIMÁTICOS A BASE DE NÍQUEL PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

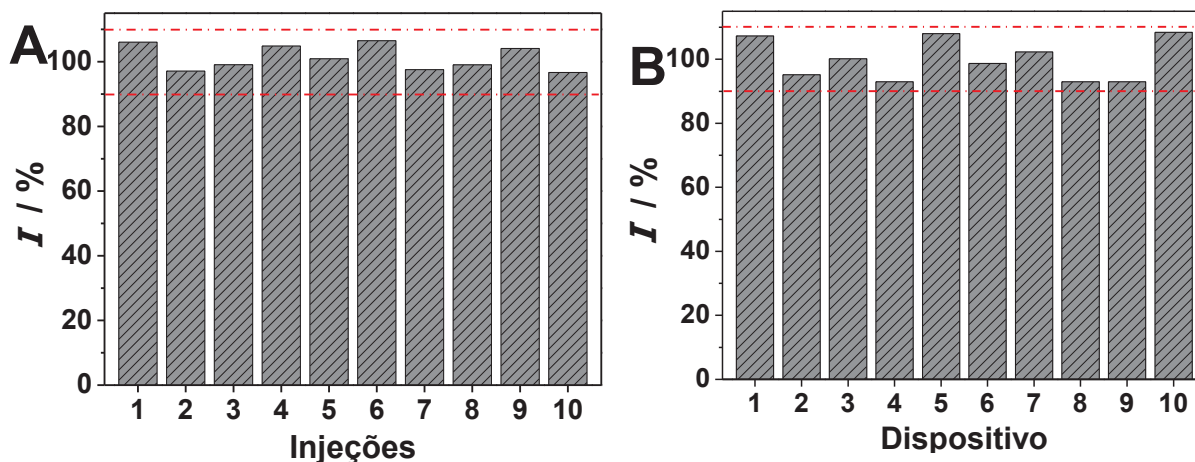
| Amostra | Eletrodo | LDR ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Sensibilidade ($\mu\text{A L mmol}^{-1}$) | Ref. |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|----------------------|
| Soro sanguíneo e Saliva | EPCM-NiN2 | 5,0–1000 | 0,140 | 19,4 | <i>Este trabalho</i> |
| NaOH ^a | Ni/POAP/EPC | 100–2700 | 90,0 | 38,0 | [69] |
| Soro sanguíneo | Ni@PSi-CPE | 2,0–5000 | 0,200 | 30,6 | [75] |
| NaOH ^a | Ni(OH) ₂ -NND | a: 20–1000 b: 1000–9000 | 1,20 | a: 3,20 ^b b: 1,41 ^b | [89] |
| Suco | NanoNi/Ti | 50–600 | 1,20 | 7,32 ^b | [316] |
| NaOH ^a | NiONP/EPC | 1,0–110 | 0,160 | 43,9 | [317] |
| NaOH ^a | NiO-MFs/FTO | 1,0–270 | 0,033 | 1,78 ^b | [318] |
| Soro sanguíneo | NiS/ITO | 5,0–45,0 | 0,320 | 7,43 ^b | [319] |
| NaOH ^a | GC/MWCNT/NiO | 200–12000 | 160 | 13,7 | [320] |

^aSensores não aplicados em amostras. ^bUnidade de sensibilidade: $\text{mA mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$.

Ni/POAP/EPC: Partículas de níquel dispersas em uma película de poli(o-aminofenol); Ni@PSi-EPC: Nanopartículas de níquel suportadas em silício poroso; Ni(OH)₂-NND: Eletrodo de nanodiamantes incorporado com nitrogênio modificado com hidróxido de níquel; NanoNi/Ti: Eletrodo de níquel em nanoescala suportado por titânio; NiONP/EPC: Nanopartículas de óxido de níquel; NiO-MFs/FTO: Microfibras de óxido de níquel imobilizadas em óxido de flúor e estanho; NiS/ITO: NiS-nano eletrodepositado em ITO; GC/MWCNT/NiO: Eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e óxido de níquel (II).

O método proposto também apresentou baixos desvios relativos para injeções consecutivas ($n=10$), realizadas em um mesmo dia com o mesmo dispositivo (repetibilidade) e montando diferentes sistemas de medida em 10 dias diferentes (reprodutibilidade). Com base nos resultados observados na FIGURA 54, foram obtidos os valores de desvio padrão relativo (RSD) de $\pm 3,84$ e $\pm 6,38$ %, para os dois estudos, respectivamente. Esses resultados demonstram que a utilização do método é adequada e confiável para a determinação de glicose, com ausência de oscilações nas medidas em fluxo, além de um bom controle no processo de montagem do sistema microfluídico.

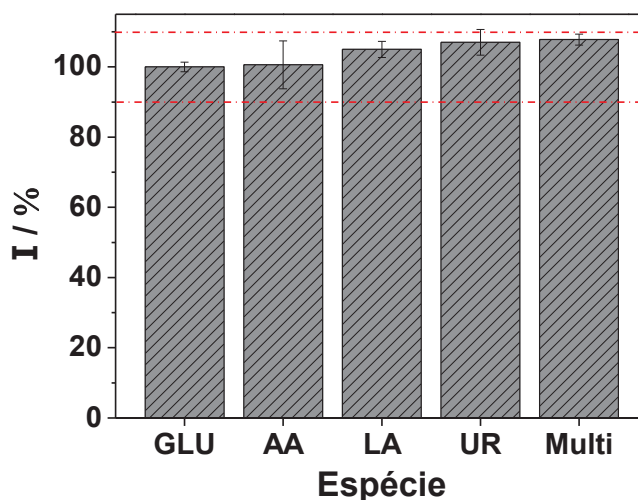
FIGURA 54 – VALORES DE CORRENTE RELATIVA OBTIDOS PARA MEDIDAS CONSECUTIVAS DE GLICOSE PARA AVALIAR A REPETIBILIDADE (A) E A REPRODUTIBILIDADE DO SISTEMA (B). ELETRÓLITO SUPORE: KOH 30 mmol L⁻¹. VOLUME DE INJEÇÃO: 2,0 µL



4.4.4 Efeito de Espécies Concomitantes

A resposta amperométrica de 1,0 mmol L⁻¹ de glicose foi avaliada em função da presença de espécies concomitantes encontradas em amostras biológicas, isoladamente e também em uma solução multicomponente (Multi). Foram avaliadas as seguintes substâncias: ácido ascórbico (AA), ácido láctico (LA) e ureia (UR). Os resultados obtidos para os valores de corrente relativa são apresentados na FIGURA 55.

FIGURA 55 – CORRENTES DE PICO RELATIVAS OBTIDAS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES CONCOMITANTES PARA A DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE



Para este estudo, também considerou-se como não interferente as substâncias que não ultrapassassem $\pm 10\%$ dos sinais de resposta para a glicose. Assim, nenhuma influência significativa foi observada para os sinais de resposta da glicose na presença das espécies avaliadas, tanto isoladamente, quanto na solução multicomponente. Isto significa que não houve efeitos de matriz significativos, e o método proposto pode ser aplicado com eficiência para a determinação de glicose em amostras biológicas sem interferências da amostra.

4.4.5 Determinação Não-enzimática de Glicose em Amostras de Saliva e Soro Sanguíneo Humano

Em geral, a glicose pode ser encontrada em concentrações que variam de 0,02 a 0,2 mmol L⁻¹ em amostras de saliva [206] e de 2,0 a 20 mmol L⁻¹ em soro sanguíneo humano [315], para pessoas não diabéticas e diabéticas. A determinação de glicose foi realizada para as amostras reais e fortificadas com solução padrão de glicose, em concentrações de 0,30 e 0,50 mmol L⁻¹. Os resultados obtidos podem ser visualizados na TABELA 21.

TABELA 21 – CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE ENCONTRADA E RECUPERADA, PELO MÉTODO NÃO-ENZIMÁTICO, PARA AS AMOSTRAS DE SALIVA E SORO SANGUÍNEO (N = 3)

| Amostra | Encontrado (mmol L ⁻¹) | Adicionado (mmol L ⁻¹) | Recuperado | |
|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------|
| | | | (mmol L ⁻¹) | (%) |
| Saliva | 0,282±0,061 | 0,300 | 0,607±0,031 | 108±2,56 |
| | | 0,500 | 0,784±0,034 | 100±2,09 |
| Soro sanguíneo | 2,84±0,085 | 0,300 | 3,18±0,07 | 113±2,85 |
| | | 0,500 | 3,37±0,03 | 106±1,67 |

Concentrações de 0,282 mmol L⁻¹ (5,08 mg dL⁻¹) e 2,84 mmol L⁻¹ (51,2 mg dL⁻¹) de glicose foram encontradas nas amostras de saliva e soro, respectivamente, e que são concordantes com as concentrações normalmente presentes nessas amostras [206]. Após as adições de glicose, valores de recuperação entre 100 a 113 % foram obtidos, concordantes com a concentração a adicionada, em um nível de confiança de 95 % (teste estatístico *t-Student*). Tais resultados indicam que excelentes resultados analíticos podem ser obtidos pela utilização dos sensores não enzimáticos, sem a presença de efeitos significativos de matriz.

4.4.6 Método Verde (Eco-Escala)

A presente metodologia foi avaliada em função da possibilidade de ser classificada como um método analítico verde. Para isso, foi realizado o cálculo de Eco-Escala (*Eco-Scale*), utilizando o procedimento adaptado por Gałuszka e colaboradores [134]. A TABELA 22 mostra os Pontos de Penalidade (PPs) calculados e associados aos reagentes utilizados, consumo de energia e resíduos gerados para o desenvolvimento da metodologia proposta. Resumidamente, um método verde ideal tem uma pontuação de 100 pontos na escala ecológica e o valor real de Eco-Escala para um método é calculado pela subtração da soma de PPs do valor ideal (Eco-Escala = 100 – \sum PPs).

TABELA 22 – PONTOS DE PENALIDADE (PPs) OBTIDOS PARA O MÉTODO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DE GLICOSE

| REAGENTES | | | |
|--|--------------------------------------|--------|-------------------------------|
| Reagente | Pictogramas | Sinal | PPs |
| Ácido nítrico (50%) | 2,0 | Perigo | 4,0 |
| Acetato de sódio (0,10 mol L ⁻¹) | 0,0 | - | 0,0 |
| Hidróxido de níquel (0,003 mol L ⁻¹) | 2,0 | Perigo | 4,0 |
| Hidróxido de potássio (0,01 mol L ⁻¹) | 1,0 | Perigo | 2,0 |
| D(+)-Glicose | 0,0 | - | 0,0 |
| | | | Σ10 |
| INSTRUMENTAÇÃO | | | |
| Técnica | Observação | PPs | |
| Voltamétrica e Amperométrica | Energia usada < 0,10 kWh por amostra | 0,0 | |
| Aquecimento | 400 °C, 1,0 h ^a | 2,0 | |
| Filtração simples | | 0,0 | |
| Condições especiais | Coleta e armazenamento de amostra | 2,0 | |
| Risco ocupacional | Processo de hermetização | 0,0 | |
| Resíduos | > 10 mL | 5,0 | |
| | | | Σ9,0 |
| Pontos de Penalidade Total | | | Σ19 |
| Eco-Escala Analítica Total | | | Σ81 |

^aObtenção de biochar pelo processo de pirólise.

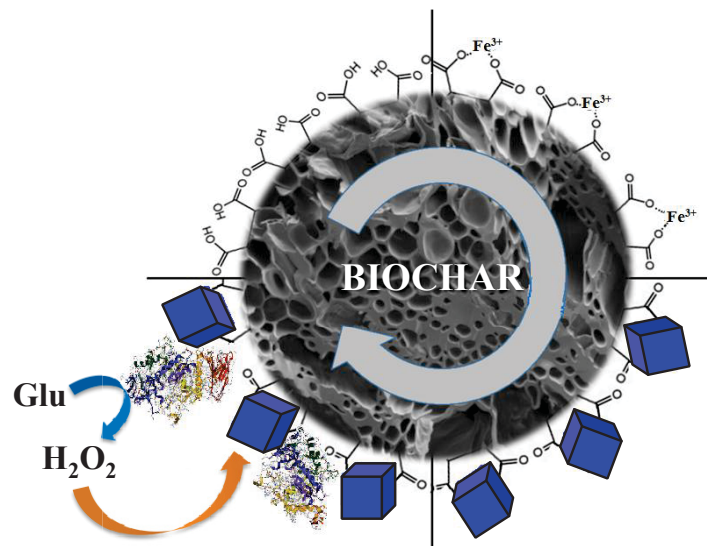
De acordo com a Eco-Escala, o valor calculado para o método proposto foi de $\Sigma 81$, o que classifica o método como um excelente procedimento verde, caracterizado com pontuação $\Sigma > 75$ pontos [321]. Nesse sentido, os principais objetivos dos métodos analíticos considerados verdes foram alcançados, sendo estes a redução de reagentes, o consumo de energia e a geração de resíduos [133]. O sistema microfluídico (μ TED) usufrui de pequenas quantidades de soluções e amostras e não requer nenhum sistema de propulsão, uma vez que a solução é transportada por capilaridade e força gravitacional ao longo de canais microfluídicos. Outro ponto a ser destacado está associado ao uso de técnicas eletroquímicas que podem ser consideradas promissoras técnicas analíticas verdes. Também é relatado que a etapa menos verde no processo analítico é a preparação da amostra [135]. Neste caso, a única etapa de preparação da amostra de saliva foi a diluição com solução de KOH, não penalizando pontuação. Já a amostra de soro sanguíneo exigiu procedimentos adicionais, sendo estes a etapa de separação por centrifugação e o armazenamento em refrigerador. Estes procedimentos promovem um maior consumo de energia, contudo, a determinação de glicose nesta amostra ainda foi considerada conveniente do ponto de vista dos procedimentos verdes. Finalmente, destaca-se que o uso do biochar como modificador dos eletrodos permitiu a utilização de uma matéria-prima renovável, economicamente e ecologicamente viável, o que deve ser levado em consideração de acordo com os princípios da química verde.

4.4.7 Conclusões Parciais para a Determinação Não-enzimática de Glicose

A partir dos resultados expostos, notou-se que o biochar ativado se apresentou como uma excelente plataforma para suportar NiOOH, demonstrando estabilidade, sensibilidade e detectabilidade suficientes para a determinação não-enzimática de glicose em amostras reais de fluidos biológicos. O uso do EPCM-N2Ni acoplado ao sistema μ TED proporcionou um bom desempenho analítico, destacando a facilidade de construção, o uso de impressoras 3D e de materiais de baixo custo para a construção do dispositivo. Somado a isso, por se tratar de um sistema microfluídico, apresentou baixo consumo de reagentes e insumos, baixo volume de injeção, frequência analítica comparável a outros dispositivos microfluídicos relatados na literatura. Devido ao uso de fios têxteis como caminho analítico, e a diferença de altura entre os reservatórios, este dispositivo também dispensa o uso de bombas ou sistemas mecânicos de bombeamento. Com isso, o método proposto foi considerado um procedimento analítico verde pelo cálculo de Eco-Escala, atingindo os principais objetivos dos procedimentos verdes.

Por fim, a aplicação do EPCM-N2Ni acoplado ao sistema μ TED, apresentou elevada potencialidade de aplicação para a determinação não-enzimática de glicose em amostras biológicas reais, com recuperação satisfatória, evidenciando a viabilidade da proposta e também o seu caráter inovador. Além disso, devido a capacidade de portabilidade, o sistema também apresenta a possibilidade de ser facilmente transportado, e utilizado como um dispositivo *point-of-care* por exemplo.

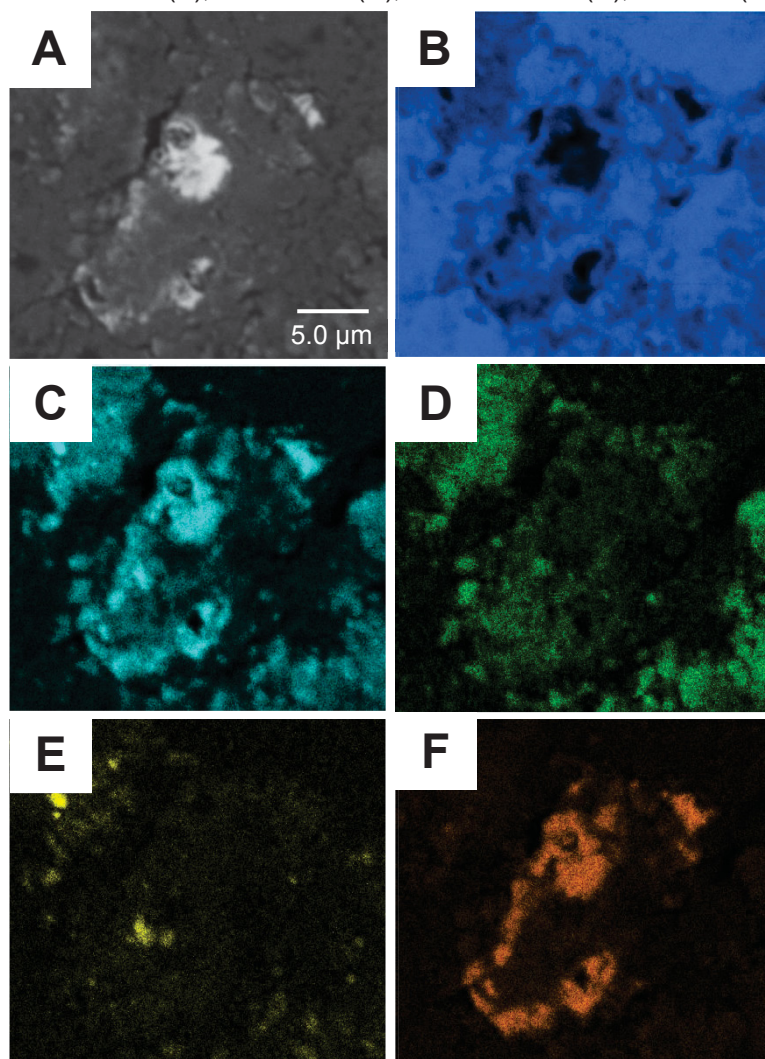
4.5 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE UTILIZANDO AZUL DA PRÚSSIA ANCORADO EM BIOCHAR ATIVADO



4.5.1 Comportamento Eletroquímico do Biossensor EPCM-N2-PB-GOx

Nesta etapa, inicialmente, foi avaliada a pré-concentração de íons Fe(III) no EPCM-N2. Visando a avaliação desta etapa, foi realizado um mapeamento químico por EDS, da superfície do EPCM-N2 contendo íons Fe(III) pré-concentrados. A superfície da pasta de carbono foi analisada por EDS, sendo obtida uma imagem representativa de MEV e os mapeamentos químicos correspondentes aos elementos carbono, oxigênio, nitrogênio, silício e ferro (FIGURA 56).

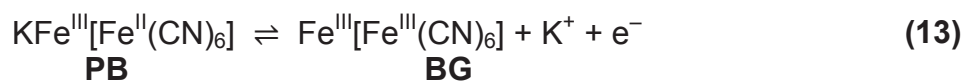
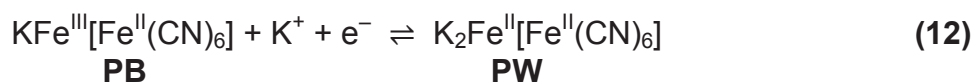
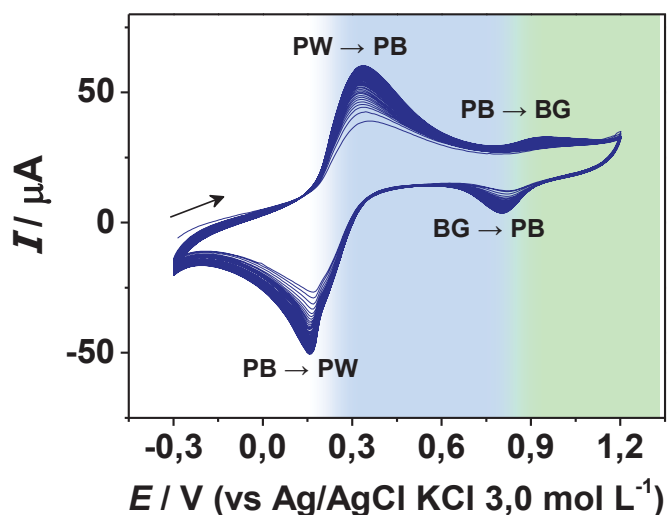
FIGURA 56 – IMAGEM DE MEV, COM AUMENTO DE 1500 VEZES (A) E MAPEAMENTO QUÍMICO OBTIDO POR EDS PARA A SUPERFÍCIE DO EPCM-N2 CORRESPONDENTE AOS ELEMENTOS: CARBONO (B), OXIGÊNIO (C), NITROGÊNIO (D), SILÍCIO (E) E FERRO (F)



Pela região analisada foi possível constatar a presença de espécies comumente encontradas no biochar. A presença de ferro foi confirmada pelo mapeamento químico mostrado na FIGURA 56-F e pelo espectro de EDS obtido para a linha de energia atribuída ao ferro (Fe L α), região laranja. Além disso, a presença de ferro foi verificada em regiões concomitantes a presença de oxigênio (O K α), região azul clara, e também a uma pequena quantidade de nitrogênio (N K α), região verde. Isso sugere que a pré-concentração de íons Fe(III) no biochar está correlacionada aos grupos funcionais presentes no material, principalmente de grupos oxigenados.

Após a pré-concentração de íons Fe(III), foi realizada a etapa de síntese do Azul da Prússia (PB) na superfície do EPCM-N2, a partir de varreduras consecutivas de potencial, na região de -0,30 a 1,2 V, durante 30 ciclos, na presença de 2,5 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆] em PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 3,0. A FIGURA 57 apresenta os voltamogramas obtidos.

FIGURA 57 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA A FORMAÇÃO DO AZUL DA PRÚSSIA (PB). ELETRÓLITO SUPORTE: K₃[Fe(CN)₆] EM PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 3,0. NÚMERO DE CICLOS: 30. v: 50 mV s⁻¹



Foi observada a presença de quatro processos faradaicos, respectivos às reações redox das espécies PB e Branco da Prússia (PW), e PB e Verde de Berlin (BG). A oxidação do PW a PB foi registrada em potencial de pico de 0,33 V, já o processo de redução do PB novamente a PW foi observado em 0,16 V. A redução do PB ocorre mediante a transferência de elétrons do eletrodo para o PB, o que é compensado pelo aprisionamento de cátions na estrutura, tal como K^+ , conforme mostrado na Reação (12). Também foram registrados os processos redox relacionados à reação de oxidação de PB em BG ou Amarelo de Berlin, no estado totalmente oxidado, em 0,93 V, e a reação reversa de redução, em 0,80 V, seguindo a Reação (13) [72, 97, 322].

De acordo com os voltamogramas obtidos para a etapa de síntese, também foi observado o aumento da intensidade dos picos de formação do PB (FeHCF) com o aumento do número de ciclos. Isso sugere o crescimento constante de um filme de PB, ancorado ao eletrodo, a partir da presença de íons Fe(III) previamente adsorvidos ao biochar e $K_3[Fe(CN)_6]$ em solução de PBS pH 3,0. Imagens de MEV da superfície do EPCM após a formação do PB são apresentadas nas FIGURAS 58 e 59. Com isso, foi possível comprovar a presença de um filme na superfície do biochar, conforme observado pela região mais clara correspondente ao modificador na pasta de carbono. O filme de PB aderido ao biochar foi também comprovado pelo espectro de EDS (FIGURA 58-B) correspondente à imagem de MEV (FIGURA 58-A).

FIGURA 58 – IMAGEM DE MEV (A) COM AUMENTO DE 1000 VEZES E ESPECTRO DE EDS (B) OBTIDOS PARA A SUPERFÍCIE DO EPCM-N2 APÓS A FORMAÇÃO DE AZUL DA PRÚSSIA

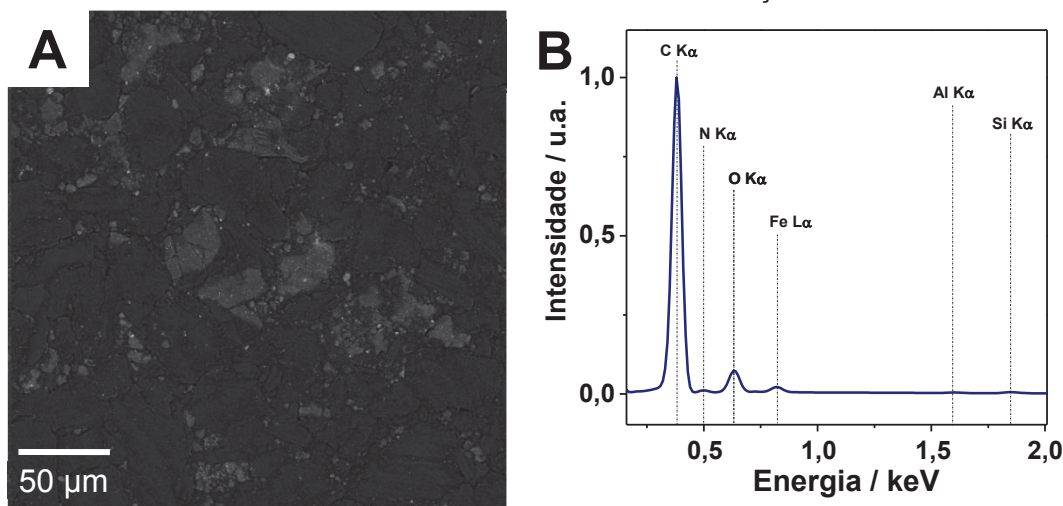
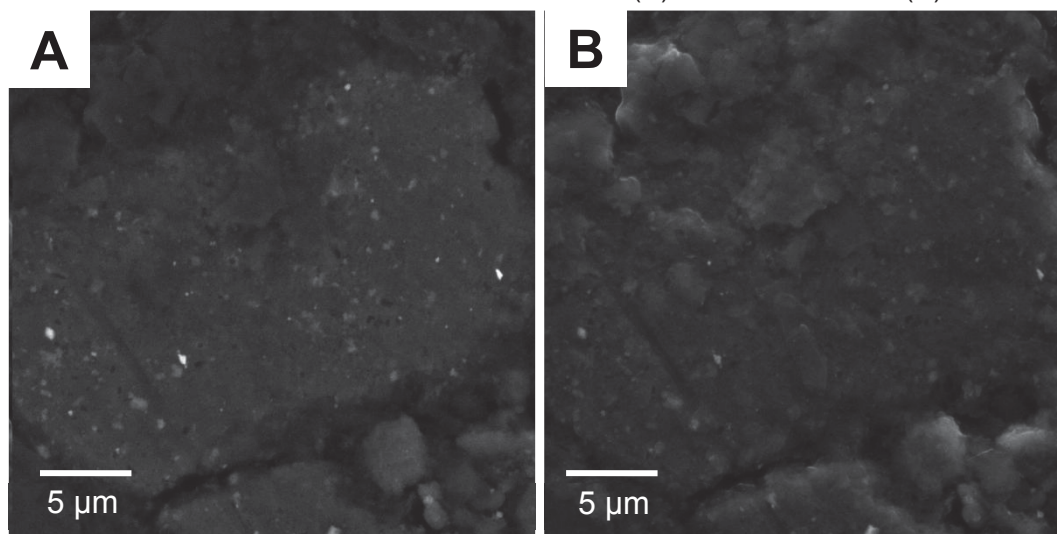
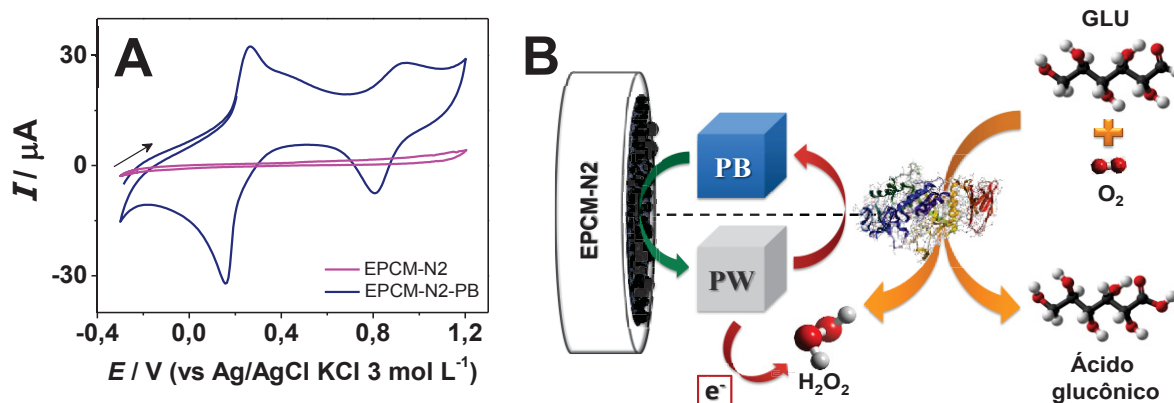


FIGURA 59 – IMAGENS DE MEV COM AMPLIAÇÃO DE 10 k VEZES, UTILIZANDO DETECÇÃO DE ELÉTRONS RETROESPALHADOS (C) E SECUNDÁRIOS (D)



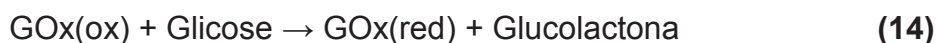
Após a etapa de crescimento, o eletrodo foi lavado e submetido a varreduras de potencial para avaliar a estabilidade do PB formado. As medidas foram realizadas em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS na ausência de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, durante 5,0 ciclos, e com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Com base nos voltamogramas obtidos antes e após a etapa de crescimento de PB (FIGURA 60-A), foi verificado que a síntese eletroquímica foi eficiente e que permitiu a formação de PB no EPCM-N2.

FIGURA 60 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS APÓS A FORMAÇÃO DO PB EM PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. v: 50 mV s^{-1} (A). ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS REAÇÕES QUE OCORREM APÓS A ADIÇÃO DE GLICOSE (B)



Verificada a eficiência na formação do PB e posterior etapa de incorporação da enzima GOx sobre este mesmo eletrodo, foi possível realizar o monitoramento da presença de glicose em solução, onde o PB reduzido (PW) atua como um mediador redox desta reação [323, 324]. O mecanismo envolvido nas reações que ocorrem na superfície do biossensor na presença de glicose pode ser ilustrado pelo esquema representativo apresentado na FIGURA 59-B. A GOx possui elevada estabilidade e especificidade com a glicose. Assim, a glicose interage com o sítio ativo da GOx, formando um complexo enzima-substrato (ES).

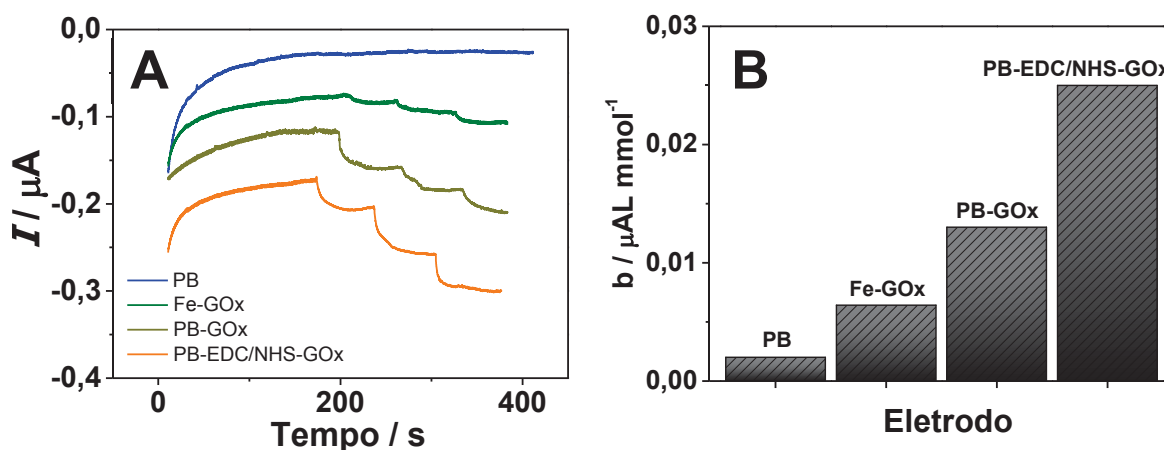
Durante a reação enzimática, a GOx catalisa a reação de oxidação da glicose em glucolactona e peróxido de hidrogênio, na presença de oxigênio molecular. Esta reação ocorre em duas etapas, conforme mostrado nas Reações (14) e (15). A glicose posteriormente é hidrolisada em ácido glucônico (reação não-enzimática). Por fim, o PB presente na superfície eletródica, com aplicação de um potencial suficientemente negativo, é reduzido a PW (Branco da Prússia). O PW reage quimicamente com o H₂O₂, reduzindo-o à OH⁻ e, conseqüentemente, o PW é oxidado a PB (Reação (16)). No entanto, o potencial se mantém suficiente para regenerar o PB em PW, o que leva a formação de um ciclo reacional e ao ganho de corrente do processo faradaico referente à redução do PB em PW. Desta forma, a determinação voltamétrica é realizada em função do sinal de resposta obtido pelo peróxido de hidrogênio formado, proporcional à concentração de glicose em solução [72, 324-326].



Este mecanismo foi comprovado após medidas amperométricas realizadas com o EPCM proposto, após adição de concentrações conhecidas e crescentes de glicose, de 1,0 a 4,0 mmol L⁻¹. Este eletrodo (PB-EDC/NHS-GOx) apresentou a incorporação do par EDC/NHS e de GOx, após a formação de PB. Além deste eletrodo, foram também avaliados diferentes configurações do biossensor, construídas com o EPCM-N2 baseado em biochar ativado. O eletrodo

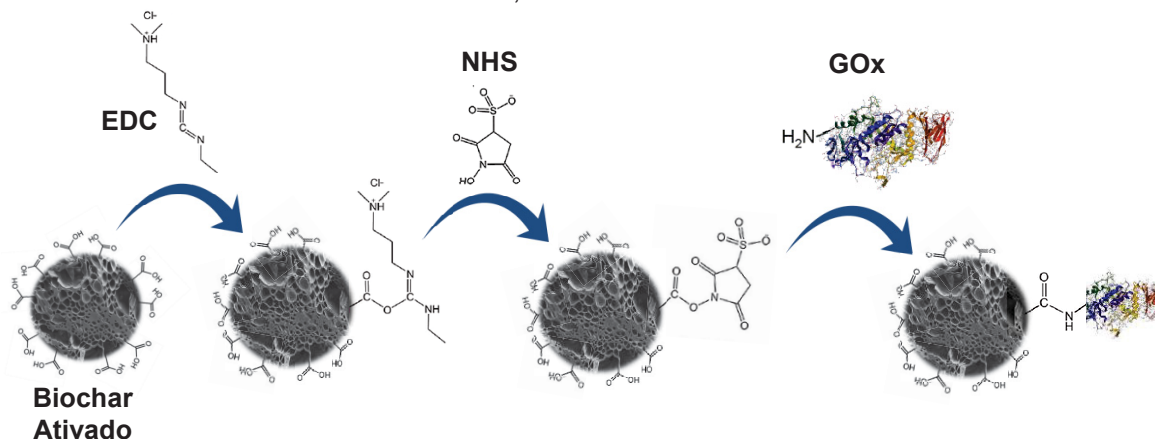
com acrônimo PB diz respeito ao EPCM-N2 com pré-concentração de íons Fe(III) e posterior formação de PB, na ausência de EDC/NHS e da enzima GOx. Também foram confeccionados e avaliados os eletrodos Fe-GOx e PB-GOx, correspondentes aos eletrodos submetidos à pré-concentração de íons Fe(III), sem e com formação de PB respectivamente, sem EDC/NHS e contendo a enzima. A FIGURA 61 mostra os amperogramas obtidos para cada eletrodo com aplicação de potencial de -0,10 V, tal como a correlação entre a sensibilidades obtidas para cada curva analítica.

FIGURA 61 – AMPEROGRAMAS (A) E INFLUÊNCIA DA SENSIBILIDADE EM FUNÇÃO DO TIPO DE ELETRODO (B). ELETRÓLITO SUPORTE: PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 7,0. POTENCIAL APLICADO: -0,10 V



Os resultados obtidos evidenciam que a maior sensibilidade foi observada após a formação do PB, e na presença do par EDC/NHS para ancorar a enzima GOx. É fato que a presença do PB é necessária, devido a se tratar de uma espécie capaz de catalisar a reação de redução do H₂O₂, e que permite a determinação indireta da glicose. Sem a formação do PB, utilizando apenas a incorporação de íons Fe(III), a conversão das reações não ocorreu de maneira significativa, com sinais de resposta pouco mensuráveis. Outra configuração explorada foi com o EPCM-N2-PB, que também não apresentou resultados significativos para a determinação de glicose, devido à ausência da enzima GOx no sensor. Desta forma, foi comprovado que a utilização do par EDC/NHS permitiu a incorporação da enzima de maneira mais efetiva, covalentemente à superfície do biochar, conforme o esquema proposto apresentado na FIGURA 62, melhorando a capacidade de catalisar a oxidação da glicose.

FIGURA 62 – ESQUEMA DE INCORPORAÇÃO DA ENZIMA GOX NA SUPERFÍCIE DO BIOCHAR ATIVADO, UTILIZANDO O PAR EDC/NHS



FONTE: O autor (2019).

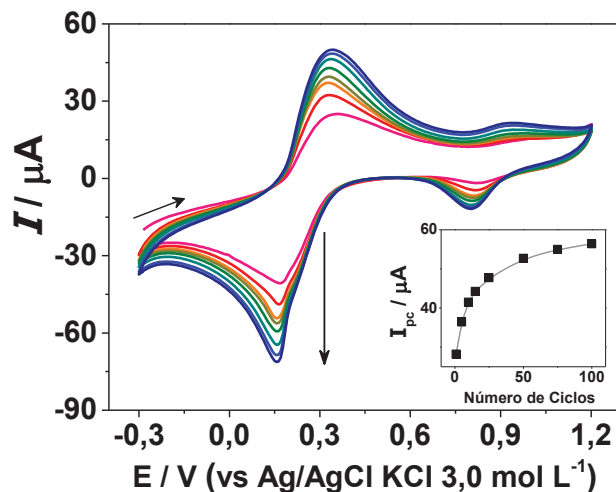
Esta estratégia é amplamente reportada na literatura e, basicamente, consiste no tratamento da superfície do eletrodo com EDC/NHS para aumentar a eficiência da imobilização enzimática. Primeiramente, o EDC interage com os grupos carboxílicos presentes no biochar. Em seguida, esta espécie permite a incorporação de NHS por um mecanismo de substituição. O NHS forma um bom grupo abandonador que é substituído por grupos amina da enzima GOx. Assim, a enzima é incorporada a superfície eletródica de maneira estável por ligações covalentes com os grupos carboxílicos do biochar [327, 328].

4.5.2 Otimização dos Parâmetros Experimentais para Determinação Enzimática de Glicose

O primeiro estudo realizado diz respeito à etapa de crescimento do PB na superfície do eletrodo, onde foi avaliada a influência do número de ciclos utilizados, de 1 a 100 ciclos, empregando voltametria cíclica, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . De acordo com os resultados apresentados na FIGURA 63, foi observado o aumento dos sinais faradaicos, proporcional ao aumento do número de ciclos. Após a utilização de 50 ciclos, não foram observadas variações significativas em relação à magnitude do sinal de redução do azul da Prússia para branco da Prússia, registrado em $0,16 \text{ V}$. Isso demonstra a estabilização do crescimento do PB na superfície do eletrodo, proporcionada pela limitação da

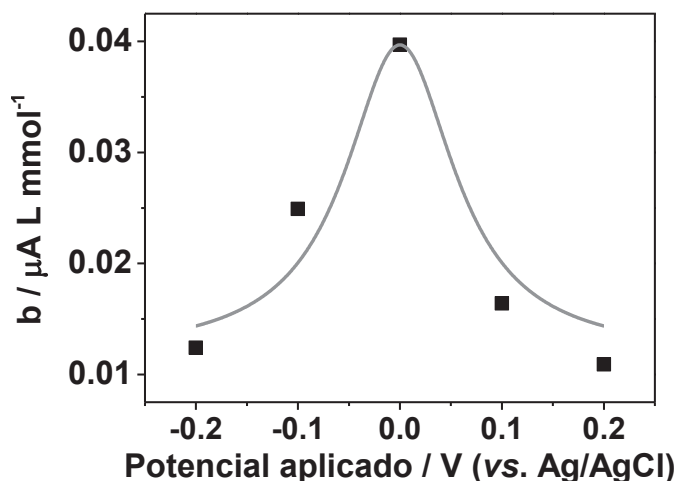
quantidade de íons Fe(III) adsorvidos ao biochar. Assim, o número de ciclos de 50 foi escolhido e utilizado para os demais estudos.

FIGURA 63 – FORMAÇÃO DE AZUL DA PRUSSIA NA SUPERFÍCIE DO EPCM-N2 EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CICLOS (NO DETALHE). ELETRÓLITO SUPORTE: PBS pH 3,0. v : 50 mV s^{-1} .



Outro parâmetro avaliado foi o potencial aplicado durante as medidas amperométricas na presença de glicose, que foi estudado de $-0,20$ a $0,20 \text{ V}$, levando em consideração o potencial de pico associado à redução do PB. Para isso, as medidas foram realizadas a partir de adições de glicose na faixa de concentração de $1,0$ a $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Curvas analíticas foram construídas para cada valor de potencial, em seguida, foi possível obter os valores de sensibilidade para a glicose em função do potencial aplicado (FIGURA 64).

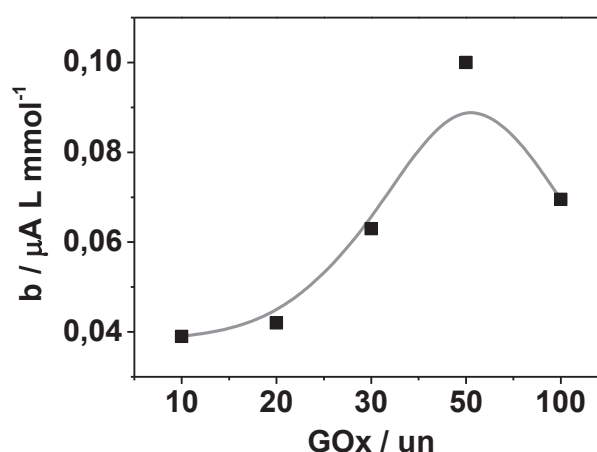
FIGURA 64 – INFLUÊNCIA DAS SENSIBILIDADES OBTIDAS EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO POTENCIAL APLICADO DURANTE AS MEDIDAS AMPEROMÉTRICAS PARA A GLICOSE. ADIÇÕES DE GLICOSE: $1,0$ A $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$



Conforme os resultados da FIGURA 64 foi observado o aumento da sensibilidade registrada para a presença de glicose, com a diminuição dos valores de potencial de 0,20 até 0,00 V. Com o potencial de 0,00 V obteve-se o maior sinal de resposta, o que permitiu a melhor redução do PB a PW, para promover a redução do H_2O_2 . Para menores valores de potencial aplicado ocorreu a diminuição significativa da sensibilidade, uma vez que o potencial não é mais suficiente para promover a mediação da reação de redução. Pode-se supor que com a aplicação destes potenciais provavelmente ocorreu também a redução do próprio solvente, constante independentemente da quantidade de glicose adicionada, o que pode ter levado a diminuição da sensibilidade [64].

A imobilização da enzima é umas das etapas cruciais no desenvolvimento de um biossensor. O método deve ser compatível com a enzima, com a superfície do eletrodo (modificador) e com o meio de trabalho, pois pode afetar a estabilidade ou atividade da enzima, tornando os seus sítios ativos menos acessíveis. Além disso, a velocidade da reação enzimática pode ser variada alterando a concentração da enzima, por isso, a quantidade de enzima imobilizada no eletrodo foi avaliada, de 10 a 100 un de GOx, em solução de PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado em 7,0 (FIGURA 65).

FIGURA 65 – INFLUÊNCIA DAS SENSIBILIDADES OBTIDAS EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA IMOBILIZADA NO ELETRODO. ADIÇÕES DE GLICOSE: $1,0$ A $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. POTENCIAL APLICADO: $0,00 \text{ V}$

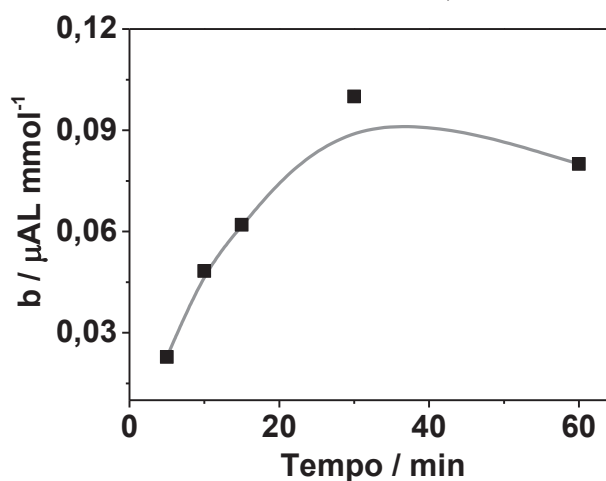


Com o aumento da quantidade GOx, foi observado um aumento dos sinais de resposta para a glicose, até a quantidade de 50 un de GOx. Isso pode ser explicável pela maior quantidade de sítios ativos disponíveis no eletrodo para

interagir com a glicose, o que aumenta a taxa da reação enzimática. Acima de 50 un de GOx foi constatada a diminuição do sinal, o que pode estar relacionado ao “bloqueio” da superfície do eletrodo, devido a grande quantidade de enzima imobilizada, e que pode interferir na condutividade elétrica do biossensor [329, 330]. Por isso, a quantidade de 50 un de GOx foi escolhida para a imobilização no biossensor.

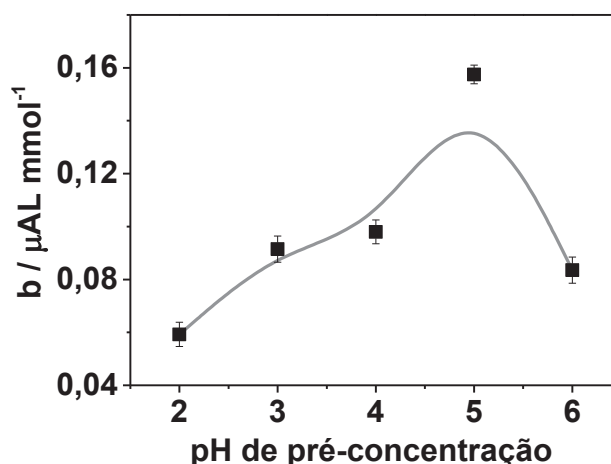
Outro parâmetro estudado, relacionado à imobilização da enzima, foi o tempo de incorporação, que foi avaliado de 5,0 a 60 min, conforme os resultados mostrados na FIGURA 66. Neste estudo a sensibilidade aumentou com o aumento do tempo de incorporação até 30 minutos, demonstrando que o maior tempo de imobilização pode promover uma incorporação mais efetiva da enzima com o a superfície do eletrodo. Com o tempo superior, de 60 minutos, foi observado um ligeiro decréscimo do sinal de resposta, o que pode estar associado à saturação da superfície do biossensor. Ou seja, a quantidade de enzima imobilizada é determinada pela quantidade de sítios disponíveis para sua interação no eletrodo. Outra possibilidade também pode estar relacionada à diminuição da condutividade do eletrodo pela maior quantidade de GOx imobilizada. Deste modo, para os demais estudos, a imobilização da enzima foi realizada com GOx 50 un, durante 30 minutos.

FIGURA 66 – INFLUÊNCIA DAS SENSIBILIDADES OBTIDAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA NO ELETRODO. ADIÇÕES DE GLICOSE: 1,0 A 4,0 mmol L⁻¹. POTENCIAL APLICADO: 0,00 V



Por fim, foi avaliado o pH da solução de pré-concentração contendo íons Fe(III) em concentração de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Vale ressaltar que apenas o pH da solução de pré-concentração foi avaliado. Para a síntese do PB utilizou-se PBS com pH ajustado em 3,0, de acordo com outros relatos da literatura [331]. Assim, este estudo foi realizado com o intuito de avaliar a melhor condição para a formação de PB no eletrodo, cujos resultados são apresentados na FIGURA 67.

FIGURA 67 – INFLUÊNCIA DAS SENSIBILIDADES OBTIDAS EM FUNÇÃO DO pH DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Fe(III) NO BIOCHAR. ADIÇÕES DE GLICOSE: 1,0 A 4,0 mmol L^{-1} . POTENCIAL APLICADO: 0,00 V



Conforme apresentado na FIGURA 67, o aumento do pH da solução promoveu um aumento significativo da sensibilidade obtida na presença de glicose, até o valor de pH igual a 5,0. Este comportamento pode ser embasado pela melhor capacidade de sorção que o biochar apresenta em valores de pH próximos a 5,0, o que foi comprovado pela avaliação do Potencial Zeta, apresentado na seção 4.1.8.

Com isso, a TABELA 23 sumariza todos os parâmetros experimentais que foram estudados com suas respectivas condições de compromisso escolhidas para a determinação enzimática de glicose, utilizando o EPCM-N2-EDC/NHS-GOx.

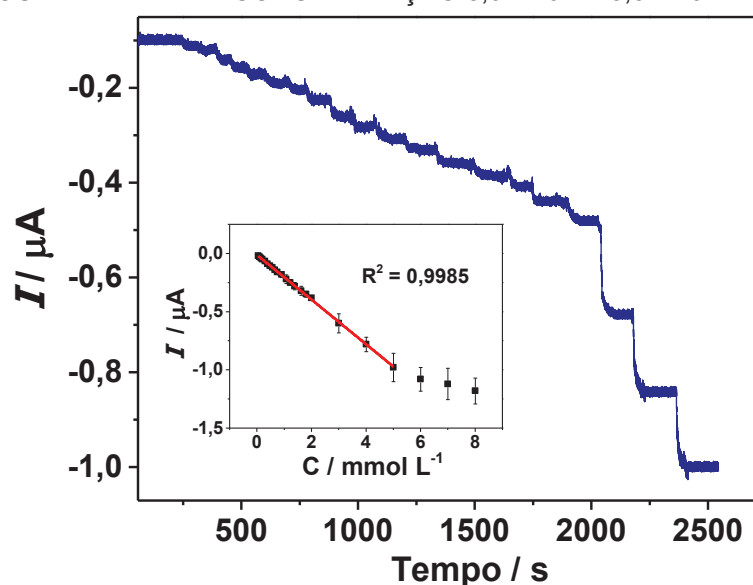
TABELA 23 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE

| Parâmetro | Condições de Compromisso |
|--|--------------------------|
| Número de ciclos (formação do PB) | 50 |
| Potencial aplicado | 0,00 V |
| Quantidade de GOx | 50 un |
| Tempo de imobilização da GOx | 30 min |
| pH de pré-concentração de íons Fe(III) | 5,0 |

4.5.3 Desempenho Analítico do EPCM-N2-PB

Utilizando os parâmetros otimizados, o desempenho analítico do método foi avaliado a partir da adição de concentrações crescente de glicose, realizadas na faixa de $1,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Para uma concentração fixa de enzima imobilizada no eletrodo, a velocidade da reação enzimática aumenta com o aumento da concentração do substrato (glicose). Com isso, foi obtida uma região linear ($R^2 = 0,9985$) entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicose, conforme apresentado na FIGURA 68, seguindo a equação: $I (\mu\text{A}) = 0,192 C_{\text{GLU}} (\text{mmol L}^{-1}) - 0,0125$.

FIGURA 68 – AMPEROGRAMAS E CURVA ANALÍTICA (INSERIDA) OBTIDOS PARA ADIÇÕES DE GLICOSE NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO $5,0 \times 10^{-5}$ A $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (N=3)



Com a sensibilidade obtida de $0,192 \mu\text{A L mmol}^{-1}$, os limites de detecção e quantificação puderam ser calculados utilizando as Equações (2) e (3), sendo obtidos os valores de $0,938$ e $2,05 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes limites foram considerados bastante satisfatórios, considerando a determinação de glicose em amostras biológicas. Além disso, deve-se considerar a complexidade atrelada ao desenvolvimento de um biossensor baseado em pasta de carbono. Em seguida, foi avaliada a afinidade enzima-substrato, pela constante cinética aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}). Utilizando a equação da reta obtida a partir da curva analítica e a Equação (1) adaptada de Lineweaver-Burk, foram obtidos os termos $1/i_s$ e $1/C_{GLU}$, sendo obtida a Equação (4). Assim, a constante K_M^{app} foi calculada pela multiplicação entre o coeficiente angular da reta e a corrente máxima i_{max} , sendo obtido o valor de $4,16 \text{ mmol L}^{-1}$.

$$\frac{1}{i_s} = 0,4702 + 0,00426x \frac{1}{C_{GLU}} \quad (4)$$

Paralelo a isso, o desempenho analítico do dispositivo proposto pôde ser comparado a outros biossensores, contendo Azul da Prússia e GOx, para a determinação enzimática de glicose, de acordo com os dados expostos na TABELA 24. O método proposto apresentou potencialidade analítica para a determinação enzimática de glicose, com região linear, limite de detecção e sensibilidade comparáveis ao demais trabalhos apresentados na literatura. Isso permitiu evidenciar a sua aplicação para a determinação em amostras reais de fluídos biológicos. Em relação a constante K_M^{app} calculada, notou-se que o valor obtido também foi concordante e próximo a maioria dos valores reportados nos trabalhos supracitados, sendo que quanto menor o valor de K_M^{app} , maior será a afinidade enzima-substrato [339]. Assim, pode-se dizer que há uma boa afinidade existente entre a enzima GOx e a glicose (substrato), em comparação aos trabalhos citados, o que facilitou as reações subsequentes, permitindo a determinação de glicose.

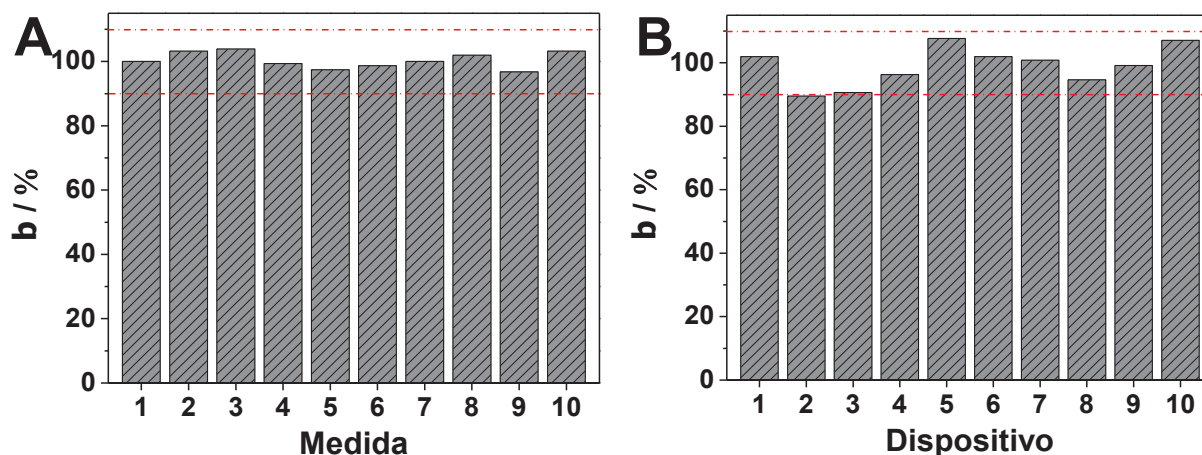
TABELA 24 – DESEMPENHO ANALÍTICO DE SENSORES ENZIMÁTICOS A BASE DE AZUL DA PRÚSSIA E GOx PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

| Amostra | Eletrodo | LDR (mmol L ⁻¹) | LOD (μmol L ⁻¹) | Sensibilidade (μAL mmol ⁻¹) | K_M^{app} (mmol L ⁻¹) | Ref. |
|--|---------------|--------------------------------|--------------------------------|--|--|----------------------|
| Saliva e soro sanguíneo | EPCM-N2-PB | 0,05–5,0 | 0,94 | 0,192 | 4,16 | <i>Este trabalho</i> |
| Soro Sanguíneo | CS-PB-G | 0,03–1,0 | 10 | 641 ^b | * | [332] |
| PBS ^a | PoPD-GA-PB-Au | 0,05–10 | 8,0 | 1,25 | 19,6 | [333] |
| Soro sanguíneo bovino | PB-CNT-CS | 0,025–1,3 | 7,5 | 15,2 ^b | 3,67 | [334] |
| PBS ^a | PBNP-GE | 0,18–1,1 | 65 | 1,59 ^b | 0,73 | [335] |
| Soro sanguíneo | PB-CS-Au | 0,002–0,4 | 0,40 | 2,57 | 3,73 | [336] |
| PBS ^a | GNPs-PbNW | 0,005–2,2 | 2,0 | 135,5 ^b | 4,58 | [337] |
| Suplemento energético e de reidratação | PB-SPCE | 0,25–2,0 | 10 | 2,14 | * | [338] |
| Soro sanguíneo | PCPB-Pt | 0,10–2,0 | 100 | 50,63 ^b | 3,49 | [339] |

^aSensores não aplicados em amostras. ^bUnidade de sensibilidade: $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$. *Dados não fornecidos. CS-PB-G: Eletrodo de grafite modificado com azul da Prússia e uma membrana de quitosana. PoPD-GA-PB-Au: Eletrodo de carbono vítreo modificado com ouro e azul da Prússia, com filme de poli(o-fenilenodiamina) e glutaraldeído. PB-CNT-CS: Eletrodo compósito a base de nanotubos de carbono e azul da Prússia com quitosana. PBNP-GE: Eletrodo de grafite modificado com nanopartículas de azul da Prússia. PB-CS-Au: Eletrodo de ouro modificado com quitosana e azul da Prússia. GNPs-PbNW: Eletrodo de platina modificado com nanofios de azul da Prússia decorados com nanopartículas de ouro. PB-SPCE: Eletrodo impresso modificado com azul da Prússia. PCPB-Pt: Eletrodo de platina modificado com compósito de carbono poroso e azul da Prússia.

Além disso, comparando os biossensores empregados pelos referidos métodos, foi observado que são raros os eletrodos a base de pasta de carbono utilizados. Sendo que a boa reprodutibilidade dos resultados obtidos com este tipo de eletrodo provém em grande parte da boa homogeneização dos componentes da pasta. Neste sentido, o método foi também avaliado em função da repetibilidade e reprodutibilidade, para medidas consecutivas utilizando um mesmo biossensor e após a construção de 10 sensores diferentes, respectivamente (FIGURA 69).

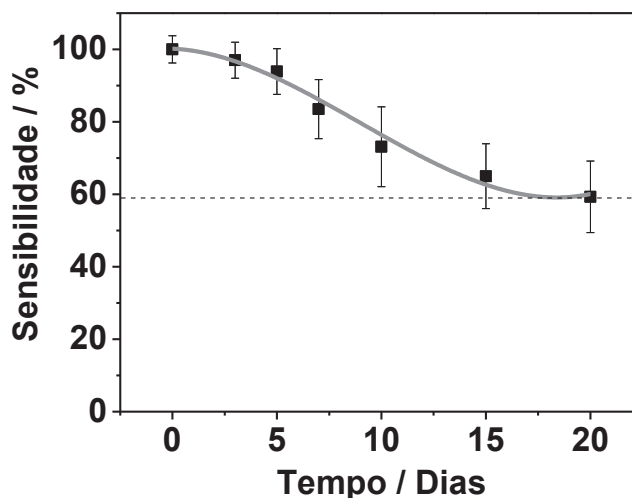
FIGURA 69 – VALORES DE SENSIBILIDADE RELATIVA OBTIDOS PARA MEDIDAS CONSECUTIVAS DE GLICOSE PARA AVALIAR A REPETIBILIDADE (A) E A REPRODUTIBILIDADE (B)



Os resultados obtidos para este estudo apresentaram valores de desvio padrão relativo (RSD) de $\pm 2,51$ e $\pm 6,21$ %, para repetibilidade e reprodutibilidade, respectivamente. Isso demonstra que o método enzimático para determinação de glicose também se mostrou confiável, sem variações significativas em relação aos sinais de reposta, mesmo após a construção de biossensores diferentes. Os baixos valores de RSD obtidos sugerem que o biossensor não sofre alterações significativas durante medidas consecutivas, o que poderia ser sido afetado por condições ambientais, por exemplo. Além disso, tais resultados também podem estar relacionados à boa homogeneização da pasta de carbono e controle nos parâmetros envolvidos no processo de construção do biodispositivo.

A seguir, a estabilidade do biossensor EPCM-N2-PB-GOx também foi avaliada em função do período de armazenamento, onde foi mantido em solução de PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e temperatura de $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Para isso, medidas amperométrica foram realizadas na presença de glicose em concentrações de $1,0$ a $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. As sensibilidades obtidas a partir destas medidas foram investigadas durante 20 dias (FIGURA 70).

FIGURA 70 – VALORES DE CORRENTE RELATIVA OBTIDOS PARA MEDIDAS AMPEROMÉTRICAS NA PRESENÇA DE $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE GLICOSE PARA AVALIAR A ESTABILIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO

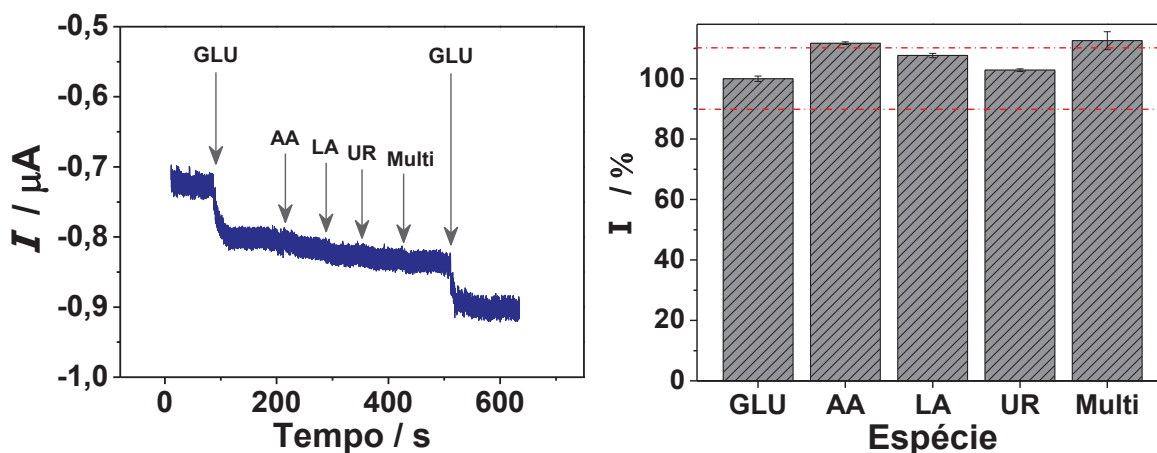


Os resultados obtidos indicam que o biossensor apresentou uma diminuição progressiva e constante nos sinais de resposta de $59,3 \pm 9,8 \%$, durante 20 dias. Esse comportamento sugere que o biossensor apresentou influência negativa em função do tempo de utilização, o que pode ser relacionado à estabilidade da enzima, ou ao início de sua desnaturação. Este fator é diretamente influenciado pela variação de temperatura, podendo levar a perda de funcionalidade do biossensor. Contudo, esta diminuição da resposta do sensor não exime a sua utilização, e pode ser contornada pela sua calibração diária previamente a cada medida realizada em amostras contendo glicose.

4.5.4 Efeito de Espécies Concomitantes

Assim como apresentado anteriormente para a determinação não-enzimática de glicose, para esta avaliação, o efeito de espécies concomitantes foi avaliado a partir de adições de algumas espécies comumente encontradas em amostras biológicas. Foram adicionadas as seguintes substâncias: $0,13 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido ascórbico (AA), 22 mmol L^{-1} de ácido láctico (LA) e 10 mmol L^{-1} de ureia (UR). Também foi estudada a potencial interferência de uma solução multielementar (Multi) de tais substâncias. As espécies foram avaliadas em função do sinal de resposta obtido na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose. Os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 71.

FIGURA 71 – AMPEROGRAMAS (A) CORRENTES DE PICO RELATIVAS (B) OBTIDOS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES CONCOMITANTES PARA A DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE



A partir dos resultados mostrados, foi observada uma variação pouco significativa em relação ao sinal de resposta registrado para a glicose após a adição de ácido láctico e ureia, sendo verificadas as variações de + 7,68 e + 2,83 %, respectivamente. Estes valores foram considerados aceitáveis. No entanto, variações do sinal de resposta maiores do que 10 % foram registrados na presença de ácido ascórbico, e também para a solução multielementar. Assim, visando contornar possíveis problemas de interferência da matriz, o método de adição de padrão foi utilizado para a determinação de glicose em amostras biológicas.

4.5.5 Determinação Enzimática de Glicose em Amostras de Saliva e Soro Sanguíneo

A aplicação do método enzimático foi realizada na determinação de glicose em amostras de saliva e soro sanguíneo humano, de maneira semelhante a apresentada anteriormente para a determinação não-enzimática. As medidas foram realizadas inicialmente nas amostras reais, após simples diluição, e em seguida, nas amostras fortificadas com glicose em dois níveis de concentração. Os resultados obtidos podem ser observados na TABELA 25.

TABELA 25 – CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE ENCONTRADA E RECUPERADA PELO MÉTODO ENZIMÁTICO, PARA AS AMOSTRAS DE SALIVA E SORO SANGUÍNEO (N = 3)

| Amostra | Encontrado (mmol L ⁻¹) | Adicionado (mmol L ⁻¹) | Recuperado | |
|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------|
| | | | (mmol L ⁻¹) | (%) |
| Saliva | 0,326 ± 0,03 | 0,300 | 0,576 ± 0,074 | 92,0 ± 1,18 |
| | | 0,500 | 0,789 ± 0,015 | 90,7 ± 2,11 |
| Soro sanguíneo | 2,20 ± 0,04 | 0,300 | 2,62 ± 0,04 | 105 ± 1,47 |
| | | 0,500 | 2,77 ± 0,07 | 103 ± 2,72 |

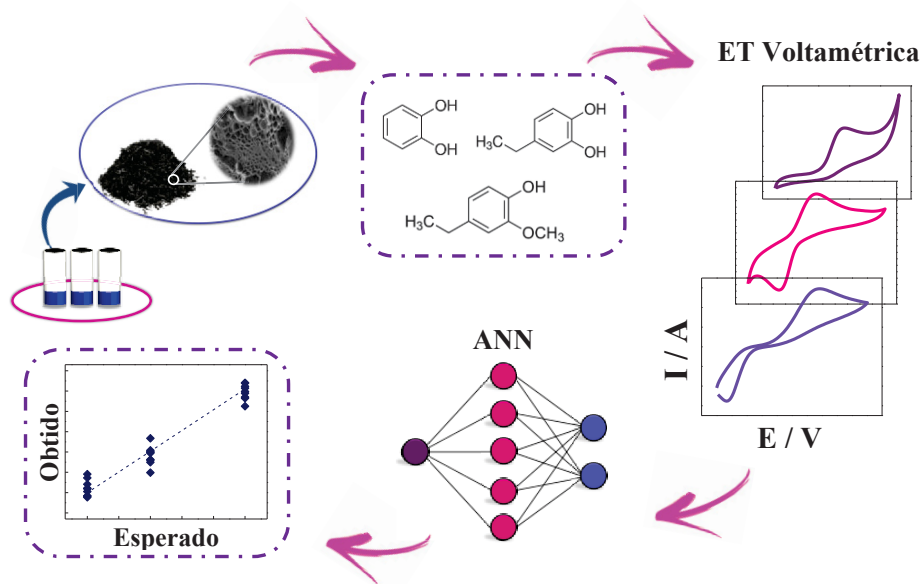
De acordo com as concentrações determinadas, de 0,326 mmol L⁻¹ (5,87 mg dL⁻¹) e 2,20 mmol L⁻¹ (39,6 mg dL⁻¹), foi possível constatar que as amostras apresentaram valores condizentes com as concentrações de glicose relatadas na literatura [243, 244]. Visando comprovar os valores adicionados, foram realizadas adições de glicose em dois níveis de concentração, sendo que estes apresentaram valores satisfatórios de recuperação, com erros relativos menores do que 10 %, em um nível de confiança de 95 %. Assim, pode-se concluir que o método analítico para a determinação enzimática de glicose foi tão efetivo quanto o método não enzimático, permitindo a aplicação de ambos com confiabilidade.

4.5.6 Conclusões Parciais para a Determinação Enzimática de Glicose

O biochar ativado mostrou-se uma plataforma interessante também para o ancoramento de azul da Prússia (hexacianoferrato de ferro) e enzima GOx, visando a determinação enzimática de glicose. O dispositivo proposto EPCM-N2-PB-GOx apresentou resultados eficientes em comparação a outros eletrodos, EPC e EPCM-BC, demonstrando que a presença de maiores quantidades de grupos funcionais no biochar ativado também foram significativas para esta estratégia. Além disso, comprovou-se que a presença do par EDC/NHS foi necessária para a melhor incorporação da enzima à superfície do biochar, melhorando os resultados obtidos para a determinação de glicose, em função do monitoramento da redução do H₂O₂. A afinidade enzima-substrato também foi avaliada, e mostrou resultados satisfatórios e comparáveis com outros trabalhos, de acordo com o cálculo da constante aparente de Michaelis-Menten.

O dispositivo apresentou uma ampla faixa de região linear, com boa sensibilidade e reprodutibilidade. O método pode ser aplicado com sucesso na determinação enzimática de glicose em amostras reais e fortificadas de fluídos biológicos (saliva e soro sanguíneo). Por fim, pode concluir que o método enzimático apresentou resultados semelhantes e tão satisfatórios quanto os obtidos com o método não-enzimático, empregando NiOOH suportado em biochar ativado. Isso enfatiza a versatilidade do uso de biochar ativado em aplicações eletroanalíticas, o que permitiu explorar diferentes estratégias de determinação. Neste caso, o presente método também poderá ser aplicado em um sistema microfluídico (μ TED), visando a minimização de reagentes, amostras e resíduos.

4.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO UMA LÍNGUA ELETRÔNICA VOLTAMÉTRICA

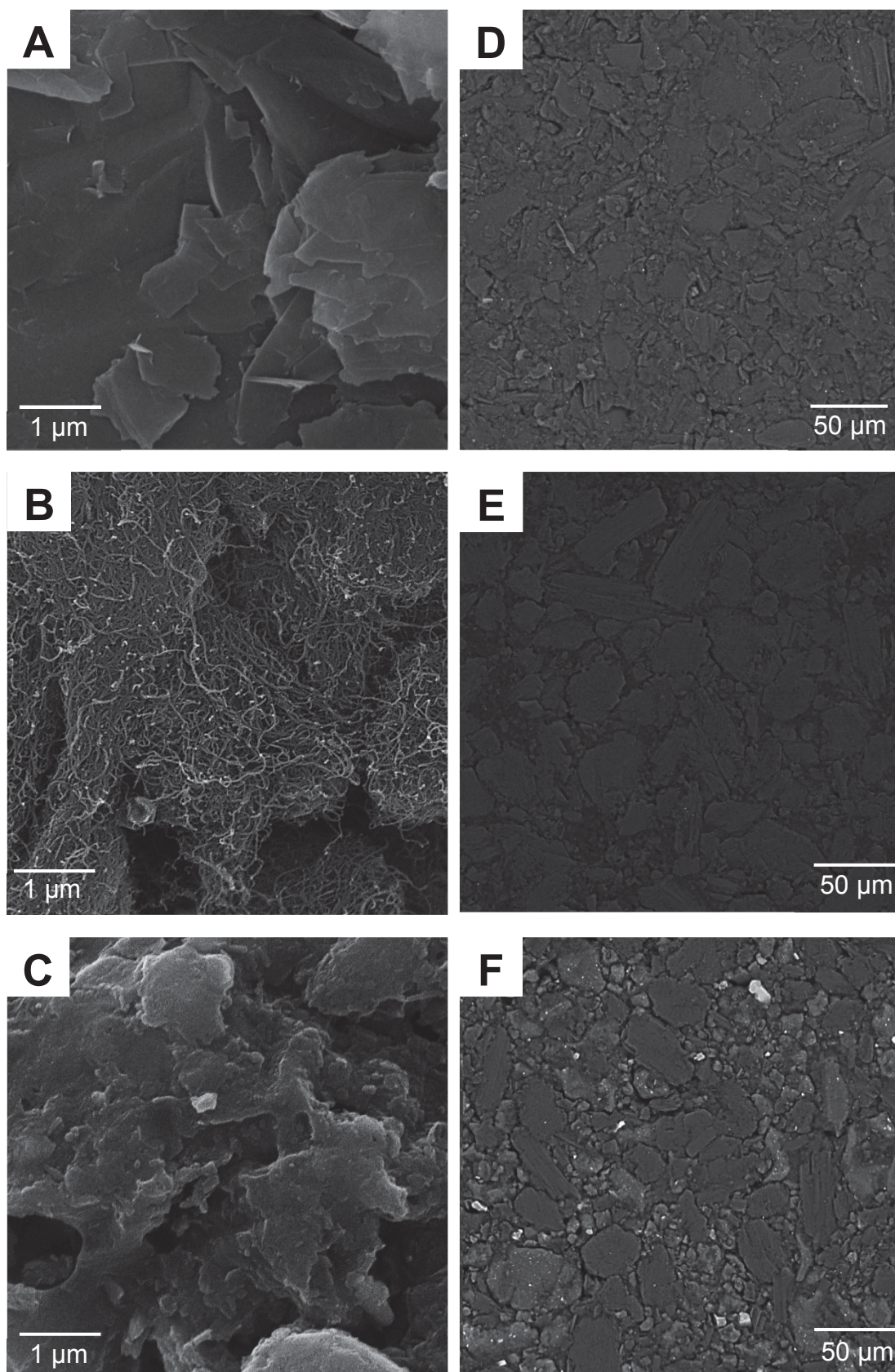


4.6.1 Caracterização Morfológica e Eletroquímica dos Eletrodos

Inicialmente foi realizada a caracterização morfológica dos materiais carbonáceos e das superfícies dos eletrodos, por MEV e composição elementar por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Imagens de MEV do grafite, dos nanotubos de carbono e do biochar ativado foram obtidas com aumento de 50.000 vezes, conforme mostrado nas FIGURAS 72-A-C, respectivamente. Já as imagens das superfícies dos respectivos eletrodos foram obtidas com aumento de 1.000 vezes, e podem ser visualizadas nas FIGURAS 72-D-F.

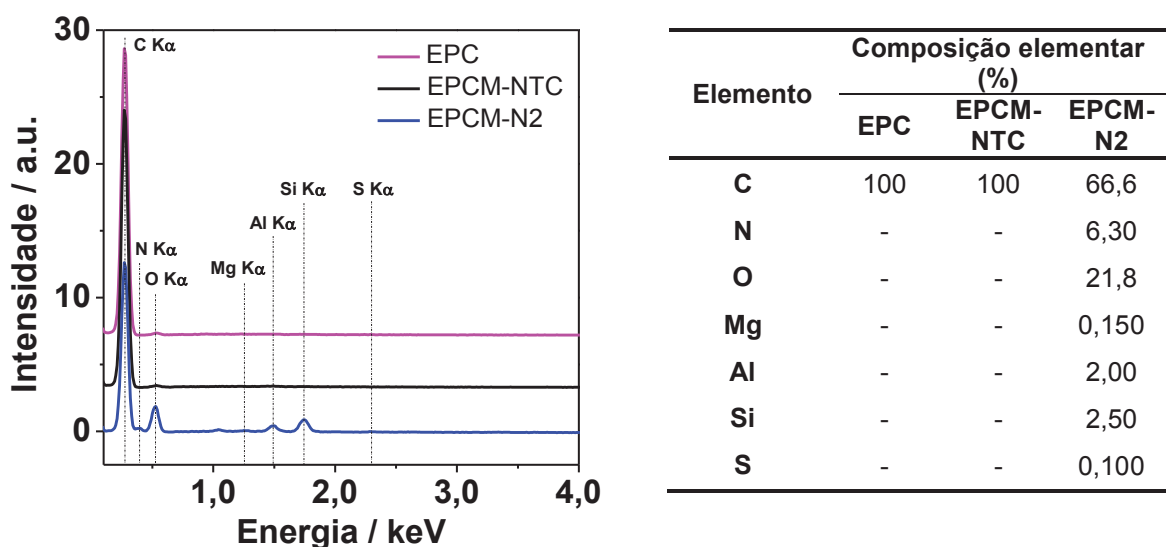
A FIGURA 72-A apresenta estruturas características de grafite, que podem ser descritas como camadas paralelas de anéis hexagonais, formando as chamadas folhas de grafite [340, 341]. A Figura 72-B apresenta imagens típicas de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, que apresentou estruturas de tamanho médio de 10 a 30 nm de diâmetro e comprimento de 1,0 a 15 μm . Já a imagem para o biochar ativado apresentou uma superfície distinta, com estrutura carbonácea irregular e porosa (FIGURA 72-C). Isso pode ser relacionado aos tratamentos térmico e químico (ativação), que promoveram o aumento de grupos funcionais e de porosidade no biochar, modificando a sua superfície [61, 247]. A superfície dos eletrodos de pasta de carbono revelou que essas três diferentes estruturas de carbono promoveram variações morfológicas aos seus respectivos eletrodos.

FIGURA 72 – IMAGENS DE MEV OBTIDAS PARA O GRAFITE (A), NANOTUBOS DE CARBONO (B) E BIOCHAR ATIVADO (C) COM AUMENTO DE 50.000 VEZES E PARA SUPERFÍCIES DOS ELETRODOS EPC (D), EPCM-NTC (E) E EPCM-N2 (F) COM AUMENTO DE 1.000 VEZES



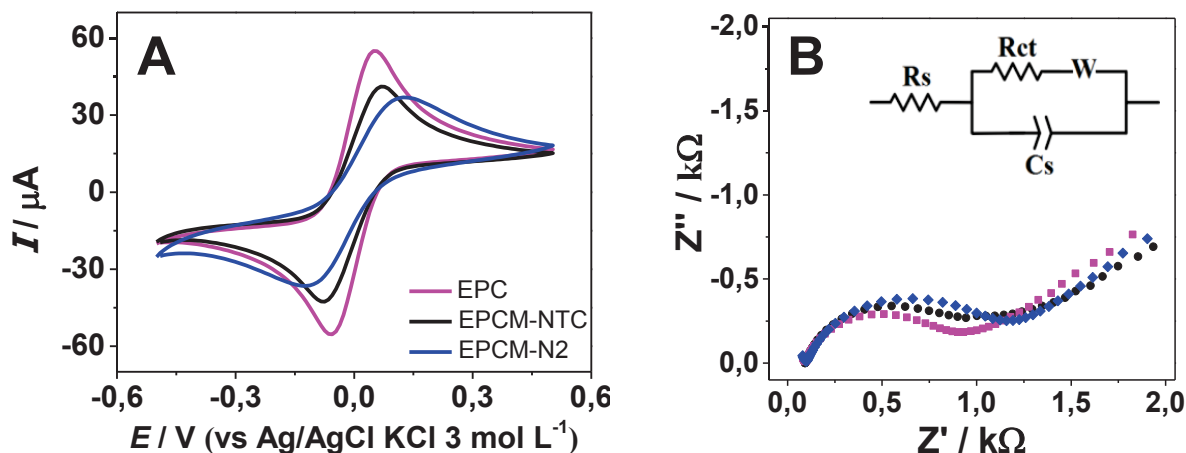
Além disso, a partir de resultados obtidos por EDS (FIGURA 73), também foram observadas variações de composição entre os materiais. O EPC foi preparado apenas com grafite e óleo mineral e mostrou uma superfície homogênea, com uma composição baseada apenas em carbono. Para o EPCM-NTC, a presença de nanotubos de carbono não interferiu na composição da pasta, uma vez que a estrutura dos nanotubos é composta por carbonos sp^2 , como o grafite [342]. Contrariamente, o EPCM-N2 apresentou uma superfície morfológica distinta, devido à presença do biochar, onde a presença de grafite foi verificada pela região mais escura e o biochar foi distinguido pela região mais clara. Conforme já explorado anteriormente em outras seções, o biochar apresenta composição majoritária, em carbono, além de exibir menores teores de nitrogênio, oxigênio e outros minerais. Essas espécies são provenientes da matéria-prima e provavelmente permaneceram após o tratamento de ativação [8].

FIGURA 73 – ESPECTROS DE EDS OBTIDOS PARA EPC, EPCM-NTC E EPCM-N2, NA REGIÃO DE 0,0 A 4,0 keV, E COMPOSIÇÃO ELEMENTAR OBTIDA A PARTIR DOS ESPECTROS



Para investigar as propriedades eletroquímicas dos eletrodos de pasta de carbono construídos, medidas de voltametria cíclica foram realizadas em solução contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, em velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . Os resultados obtidos com este estudo são apresentados na FIGURA 74-A.

FIGURA 74 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS (A) E DIAGRAMAS DE NYQUIST (B) OBTIDOS PARA OS ELETRODOS EPC, EPCM-NTC E EPCM-N2 NA PRESENÇA DE 5,0 mmol L⁻¹ DE K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]. v: 10 mV s⁻¹



Conforme apresentado nos voltamogramas obtidos foram observados processos redox relacionados à reação $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3} + e^- \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ para os três eletrodos avaliados. Neste sentido, o eletrodo não modificado (EPC) apresentou as maiores intensidades de corrente de pico, com uma separação de potenciais de pico de aproximadamente 100 mV. O eletrodo modificado com nanotubos de carbono (EPCM-NTC) mostrou um comportamento voltamétrico similar ao EPC. Já para o eletrodo modificado com o biochar ativado (EPCM-N2) foi observado um decréscimo nos sinais de resposta e um aumento na separação dos picos para os potenciais anódico e catódico. A maior variação entre os picos (ΔE_p) pode sugerir que o EPCM-N2 apresenta uma maior dificuldade de transferência eletrônica, o que pode estar relacionado à baixa condutividade elétrica do modificador. Isso também pode ser associado à carga superficial negativa, associada à presença de grupos funcionais superficiais do biochar, tal como de ácidos carboxílicos. Assim, os perfis voltamétricos observados estão de acordo com o esperado, levando em consideração os materiais que compõe os sensores, sendo que EPC e EPCM-NTC apresentam materiais com elevada condutividade elétrica (grafite e nanotubos de carbono), em comparação ao eletrodo preparado com biochar.

Em seguida, medidas de impedância eletroquímica (EIS) foram realizadas visando avaliar a transferência de carga dos respectivos sensores. As medidas foram realizadas em solução contendo 5,0 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆], com aplicação de potencial de 0,17 V (vs. Ag/AgCl), relacionado ao potencial de

oxidação do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. Com isso foram obtidos os gráficos de Nyquist para os eletrodos propostos (FIGURA 74-B). O circuito equivalente de Randles (inserido) foi proposto para ajustar os dados experimentais, o qual é composto por uma resistência em série (R_s) com um capacitor (C_s) paralelo a outra resistência (R_{ct}) e a chamada impedância de Warburg (W), resultante da difusão das espécies [343]. Com isso, foi possível obter os parâmetros elétricos correspondentes a resistência da solução (R_s), relacionada aos eletrodos de referência e de trabalho; a resistência de transferência de carga (R_{ct}), relacionada à reação redox $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; e a capacitância da dupla camada elétrica da superfície do eletrodo (C_s) (TABELA 26).

TABELA 26 – PARÂMETROS ELÉTRICOS OBTIDO POR MEDIDAS DE EIS PARA EPC, EPCM-NTC E EPCM-N2, NA PRESENÇA DE 5,0 mmol L⁻¹ DE $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (N=3).

| Eletrodo | R_s (Ω) | R_{ct} (Ω) | C_s (F) |
|----------|--------------------|-----------------------|-------------|
| EPC | 92,7 ± 0,58 | 839 ± 17,9 | 92,7 ± 7,18 |
| EPCM-NTC | 95,7 ± 1,30 | 856 ± 18,4 | 128 ± 6,15 |
| EPCM-N2 | 97,9 ± 1,10 | 970 ± 12,6 | 134 ± 0,45 |

A partir dos diagramas de Nyquist é possível observar o aumento do semicírculo ao comparar o EPC com os eletrodos modificados. Paralelo a isso, foi observado um aumento dos valores de transferência de carga (R_{ct}) de 839 para 856 e 970 Ω , em comparação ao EPC e os eletrodos modificados EPCM-NTC e EPCM-N2, respectivamente. Isso indica que a presença dos modificadores (nanotubos de carbono e biochar) promoveu um bloqueio da reação de transferência de elétrons, diminuindo a cinética do processo redox [344]. Com isso, as componentes capacitiva (Z) e resistiva (Z') do sistema foram alteradas.

Este comportamento foi concordante com os resultados voltamétricos obtidos, e consistentes com os resultados de EIS verificados em outros trabalhos que também utilizaram eletrodos modificados com materiais carbonáceos [345]. Por exemplo, Dong e colaboradores [346] demonstraram que a presença de biochar influenciou na resistência de transferência de carga do eletrodo não modificado. Neste trabalho, os autores constataram que as amostras de biochar produzidas em temperaturas moderadas (300-600 °C) apresentaram aumento de

Rct em comparação ao EPC, sendo que um aumento significativo de 495 para 3987 Ω foi verificado para após a modificação do EPC com biochar obtido a 400 °C, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$. Estes resultados podem ser explicados pelas propriedades do modificador, sendo que o biochar obtido em temperaturas moderadas (~400 °C) apresenta uma quantidade maior de carbonos desordenados, ainda remanescentes dos compostos celulósicos da biomassa e que não são condutores [347].

4.6.2 Comportamento Eletroquímico do Arranjo de Sensores

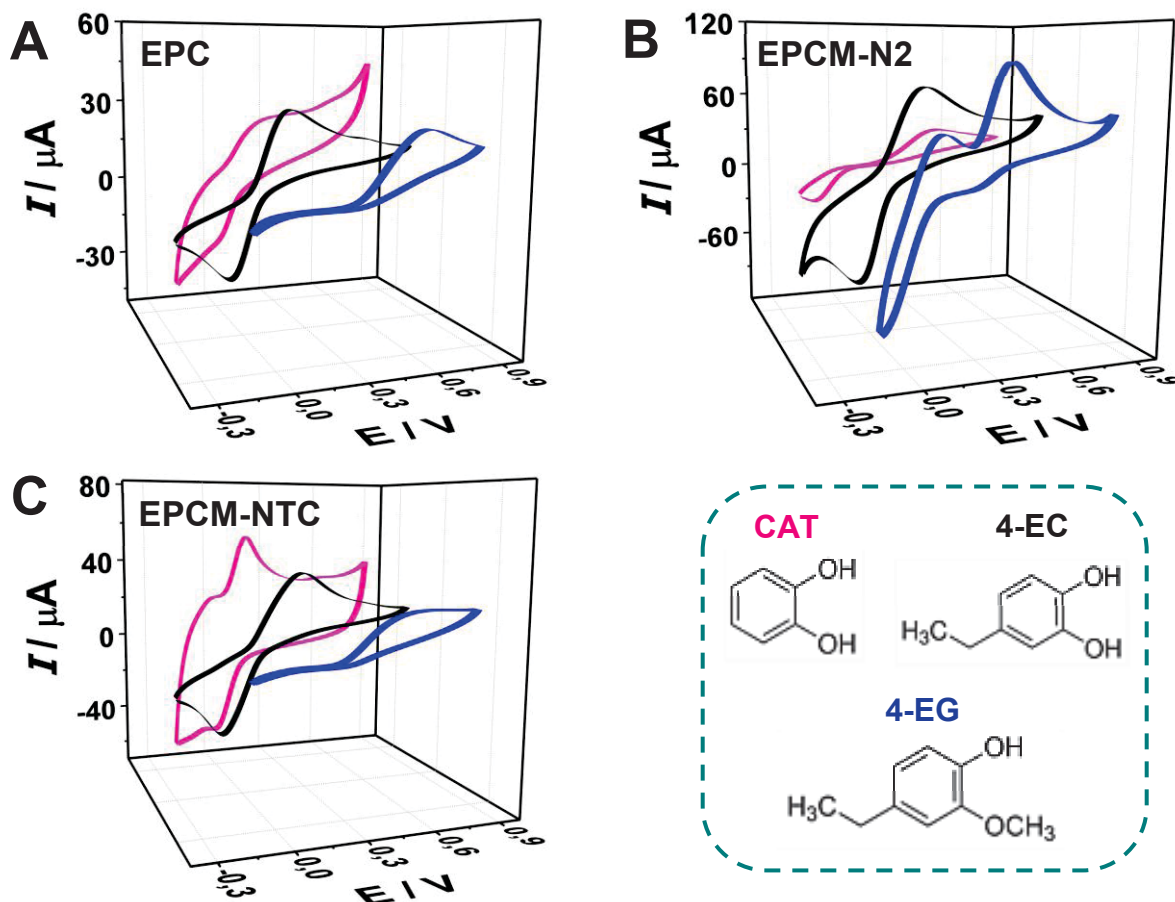
Para a determinação simultânea dos compostos fenólicos catecol (CAT), 4-etilcatecol (4-EC) e 4-etilguaiacol (4-EG), utilizou-se um arranjo composto de três sensores: um eletrodo de pasta de carbono não modificado (EPC), e dois eletrodos modificados com biochar ativado (EPCM-N2) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (EPCM-NTC). Inicialmente, as medidas de voltametria cíclica foram realizadas após a pré-concentração espontânea dos analitos individualmente, em concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Nesta estratégia, as medidas foram realizadas utilizando parâmetros experimentais e instrumentais já avaliados e otimizados em trabalhos anteriores [247, 348], conforme apresentado na TABELA 27.

TABELA 27 – PARÂMETROS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS PARA A APLICAÇÃO DA ET NA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

| Parâmetro | Condições de Compromisso |
|-------------------------------|---|
| Proporção de biochar na pasta | 20 % (m/m) |
| Tempo de pré-concentração | 5,0 min |
| Solução de pré-concentração | PBS 5,0 mmol L ⁻¹ pH 5,0 |
| Eletrólito Suporte | PBS 5,0 mmol L ⁻¹ pH 7,4 |
| Velocidade de varredura | 50 mV s ⁻¹ |
| Limpeza eletroquímica | PBS 5,0 mmol L ⁻¹ pH 7,4 -0,50 a 1,2 V; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ |

De posse destes parâmetros, foram obtidos os voltamogramas cíclicos referentes às medidas realizadas com cada sensor e para cada composto fenólico, conforme apresentado na FIGURA 75.

FIGURA 75 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS COM OS ELETRODOS EPC (A), EPCM-N2 (B) E EPCM-NTC (C) PARA OS COMPOSTOS CAT (—), 4-EC (—) E 4-EG (—). ELETRÓLITO SUPORTE: PBS 5,0 mmol L⁻¹ pH 7,4. v: 50 mV s⁻¹

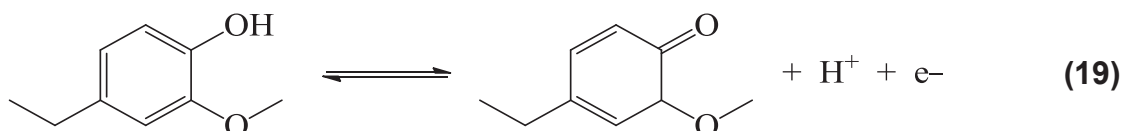
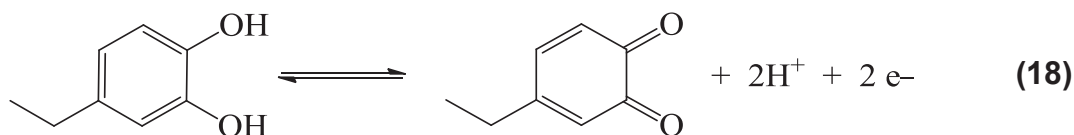
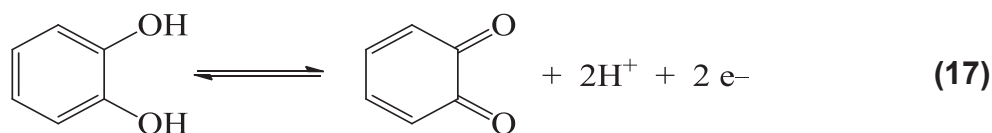


A partir dos voltamogramas obtidos foi possível verificar que todos os eletrodos foram eficientes para a pré-concentração de catecol (CAT), 4-etilcatecol (4-EC) e 4-etilguaiacol (4-EG). Além disso, sinais voltamétricos com perfis distintos foram observados para cada eletrodo, o que contribui para a discriminação e quantificação destes compostos, características desejáveis para a aplicação do arranjo de sensores em uma língua eletrônica.

De acordo com os voltamogramas obtidos, o catecol (CAT – 1,2-dihidroxibenzeno) mostrou um sinal de resposta reversível, relacionado à reação redox de formação da o-quinona (1,2-benzoquinona), conforme exemplificado pela Reação (17) [349]. Para o catecol, o eletrodo modificado com nanotubos de carbono apresentou maior magnitude de sinal, picos anódicos e catódicos foram observados nos potenciais de 0,16 e 0,00 V, respectivamente, demonstrando uma maior reversibilidade da reação redox. Já os eletrodos EPC e EPCM-N2 apresentaram um deslocamento dos potenciais de pico anódicos para 0,24 e 0,46

V, respectivamente. Além disso, o EPCM-NTC apresentou um aumento dos sinais de resposta anódica de 1,5 e 3,0 vezes, em comparação com os eletrodos EPCM-N2 e EPC, respectivamente.

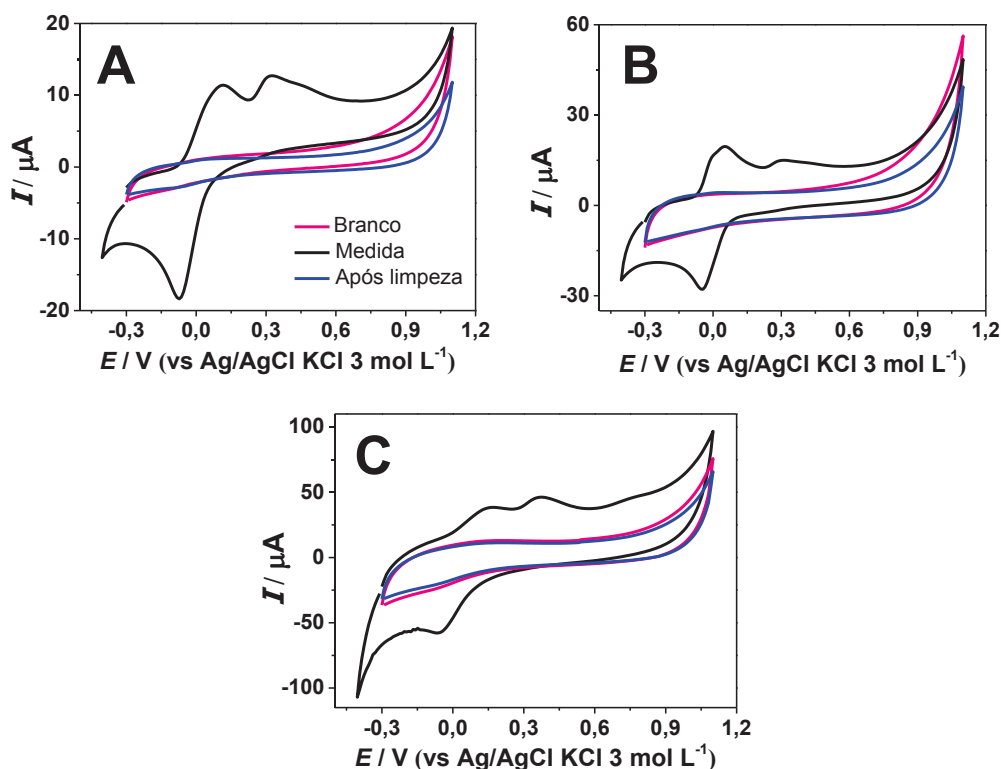
Para os fenóis voláteis 4-EC e 4-EG também foram observados processos bem definidos e mensuráveis. As reações redox para estes processos foram propostas considerando a oxidação dos compostos fenólicos para suas respectivas quinonas, conforme apresentado nas Reações (18) e (19), para 4-EC e 4-EG, respectivamente. Para estes dois compostos, o eletrodo modificado com biochar apresentou os melhores sinais de resposta, seguindo a ordem: EPCM-N2 > EPCM-NTC > EPC. Para o 4-EC, o EPCM-N2 apresentou aproximadamente o dobro do sinal de resposta em comparação aos outros eletrodos avaliados.



Estes resultados sugerem que o biochar possuiu maior afinidade para interagir e pré-concentrar os fenóis voláteis, o que pode estar atribuído a menor polaridade destes compostos, em comparação ao catecol. Conforme já discutido anteriormente, as interações entre o biochar e as espécies orgânicas podem ocorrer por meio de um mecanismo misto, tanto por fisiossorção, quanto por quimiossorção. O mecanismo de interação mais considerado ocorre entre ligações do tipo π - π entre a superfície carbonácea e os anéis aromáticos dos compostos fenólicos [61, 350, 351].

Assim, após comprovada a capacidade dos eletrodos em pré-concentrar os compostos fenólicos, observou-se que os analitos adsorvidos não foram completamente removidos da superfície do eletrodo, promovendo um “efeito de memória”. Para contornar este feito, uma etapa de limpeza eletroquímica (**Etapa 3**) foi realizada. Os eletrodos foram submetidos a varreduras de potencial de -0,30 a 1,2 V, empregando voltametria cíclica, em solução de PBS pH 7,4, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , durante 10 ciclos. Os resultados obtidos com este estudo são apresentados na FIGURA 76.

FIGURA 76 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O EPC (A), EPCM-NTC (B) E EPCM-N2 (C) NA AUSÊNCIA (BRANCO) (—) E NA PRESENÇA DE $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (—), E APÓS A ETAPA DE LIMPEZA ELETROQUÍMICA (—).

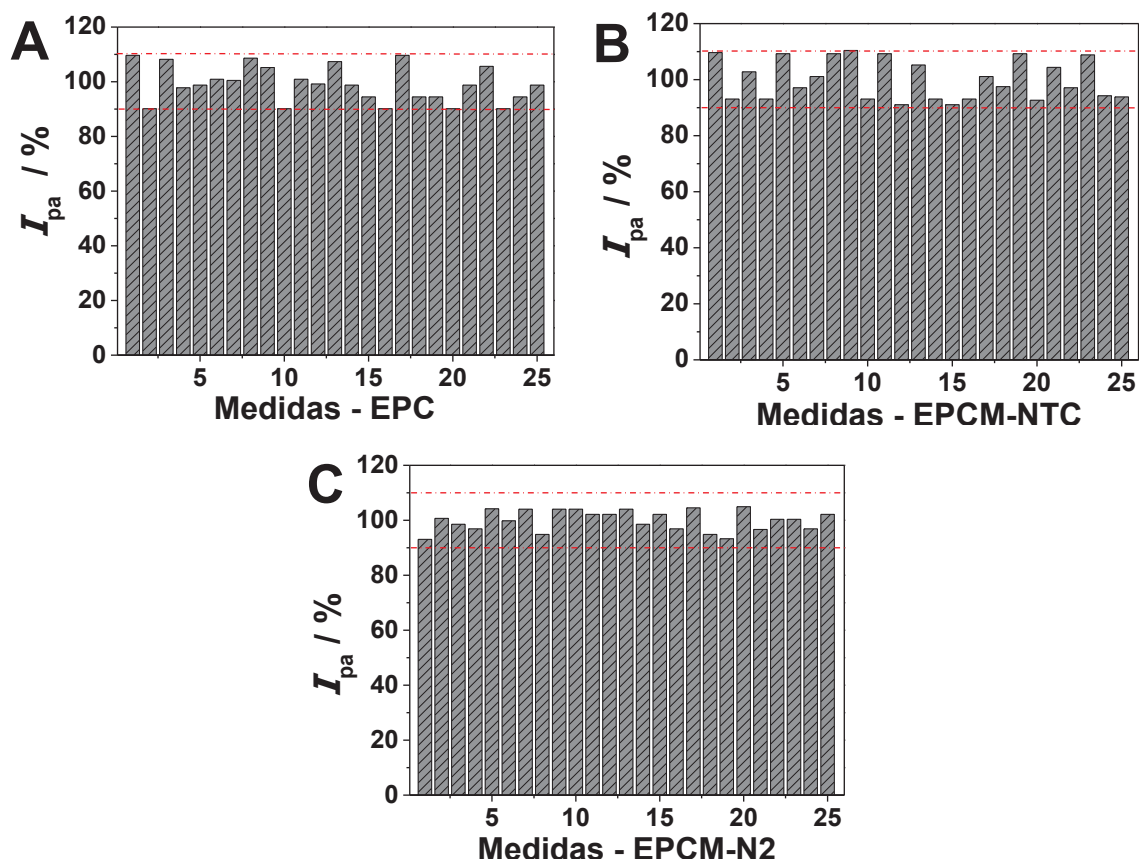


Conforme observado nos voltamogramas, após a etapa de limpeza não foram mais observados sinais faradaicos relativos aos compostos fenólicos. Isso demonstra que a etapa de limpeza eletroquímica foi efetiva para a remoção dos analitos da superfície dos eletrodos, evidenciando a ausência de qualquer efeito de memória.

4.6.3 Estudo de Reprodutibilidade

Com o intuito de garantir um bom desempenho analítico dos sensores propostos para o desenvolvimento da língua eletrônica, foi realizado um estudo de reprodutibilidade das medidas na presença dos compostos fenólicos. Para isso, 25 diferentes superfícies eletródicas (após a renovação da superfície) foram avaliadas, seguindo o procedimento experimental relatado anteriormente. A FIGURA 77 apresenta as correntes de pico anódicas relativas, obtidas com os três eletrodos em função das medidas realizadas.

FIGURA 77 – VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS RELATIVAS OBTIDAS A PARTIR DE MEDIDAS CONSECUTIVAS (N=25) EMPREGANDO EPC (A), EPCM-NTC (B) E EPCM-N2 (C) NA PRESENÇA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS



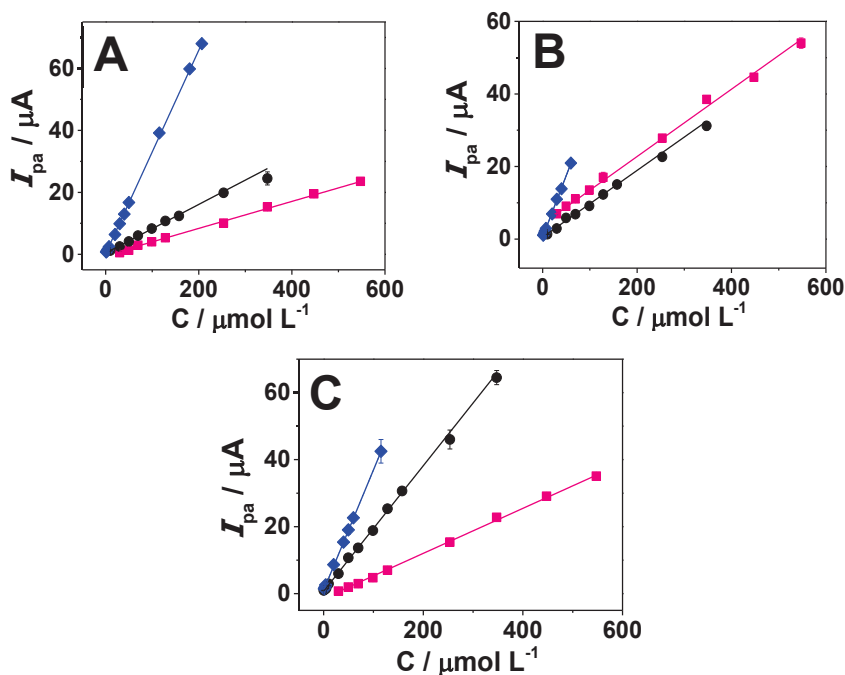
Com o estudo de reprodutibilidade, observou-se que as correntes de pico apresentaram uma distribuição aleatória durante as 25 medidas, para os três eletrodos avaliados, indicando que não há uma resposta tendenciosa após medidas consecutivas. As correntes de pico obtidas para cada medida foram comparadas à média das medidas calculadas para cada eletrodo.

A partir disso, pelos três gráficos apresentados foi possível notar que as medidas obtidas para diferentes superfícies não apresentaram variação maior do que $\pm 10,0\%$ entre si (linha tracejada vermelha). Foram obtidos valores de RSD de 6,87; 3,74 e 7,15 % para os eletrodos EPC, EPCM-NTC e EPCM-N2, respectivamente. Estes desvios demonstraram que o método apresentou boa reprodutibilidade analítica para 25 medidas sucessivas, permitindo a aplicação do arranjo de sensores possam em uma língua eletrônica voltamétrica com menores erros atrelados às medidas consecutivas.

4.6.4 Desempenho Analítico do Arranjo de Sensores

Para verificar o desempenho analítico dos eletrodos, medidas de voltametria cíclica foram realizadas após a pré-concentração espontânea de cada analito. Para isso, diferentes faixas de concentração para cada composto fenólico foram avaliadas pelos três eletrodos individualmente: de 10,0 a 600 mmol L^{-1} para CAT; de 0,100 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 4-EC e de 0,100 a 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 4-EG. Com isso, foram obtidas as curvas analíticas para EPC, EPCM-NTC e EPCM-N2, para cada composto fenólico, conforme apresentado a seguir na FIGURA 78.

FIGURA 78 – CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS POR VOLTAMETRIA CÍCLICA COM OS ELETRODOS EPC (A), EPCM-NTC (B) E EPCM-N2 (C) PARA OS COMPOSTOS FENÓLICOS CAT (■), 4-EC (●) E 4-EG (◆). ELETRÓLITO SUPORTE: PBS 5,0 mmol L^{-1} pH 7,4. v : 50 mV s^{-1}



Algumas diferenciações puderam ser constatadas com as curvas analíticas obtidas, não somente entre os sensores, mas também entre os analitos avaliados, principalmente em relação à faixa de região linear e à sensibilidade, sendo que estes e outros parâmetros analíticos obtidos a partir das curvas analíticas podem ser verificados na TABELA 28.

TABELA 28 – PARÂMETROS ANALÍTICOS OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CAT, 4-EC E 4-EG UTILIZANDO OS ELETRODOS EPC, EPCM-NTC E EPCM-N2

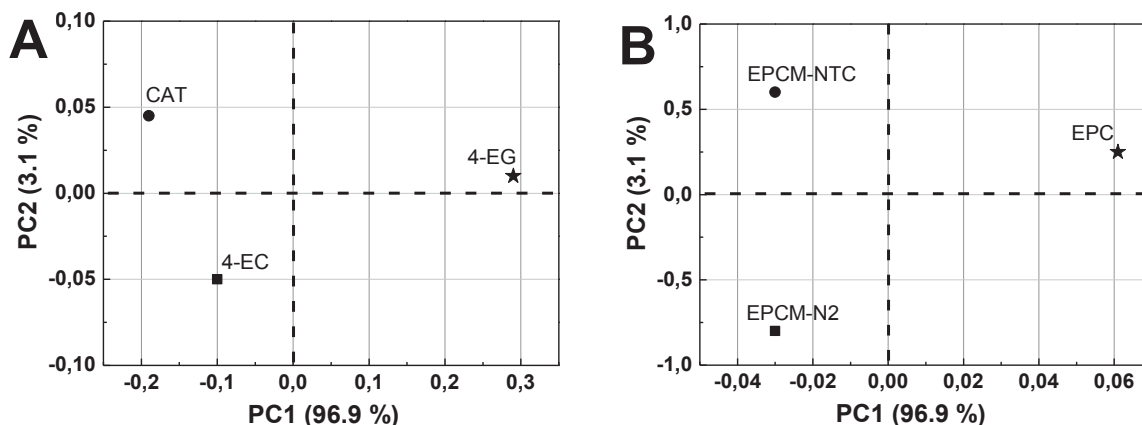
| Eletrodo | Composto Fenólico | LDR ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | R^2 | Sensibilidade ($\mu\text{A L mmol}^{-1}$) | LOD | LOQ |
|-----------------|-------------------|--------------------------------|--------|---|----------------------------|-------|
| | | | | | ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | |
| EPC | CAT | 30,0–540 | 0,9968 | 43,5 | 2,47 | 8,24 |
| | 4-EC | 10,0–350 | 0,9965 | 78,4 | 0,282 | 0,939 |
| | 4-EG | 1,00–210 | 0,9992 | 328 | 0,111 | 0,371 |
| EPCM-NTC | CAT | 30,0–540 | 0,9987 | 92,8 | 1,37 | 4,58 |
| | 4-EC | 10,0–350 | 0,9965 | 91,9 | 0,184 | 0,613 |
| | 4-EG | 1,00–60,0 | 0,9992 | 340 | 0,106 | 0,353 |
| EPCM-N2 | CAT | 30,0–540 | 0,9997 | 67,2 | 1,86 | 6,16 |
| | 4-EC | 0,200–350 | 0,9983 | 187 | 0,0863 | 0,288 |
| | 4-EG | 1,00–120 | 0,9984 | 359 | 0,0937 | 0,312 |

A partir dos resultados apresentados, observa-se que as curvas analíticas obtidas para os três sensores avaliados mostraram uma ampla região linear de 30,0 a 540 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o catecol. Valores de sensibilidade de 4,35; 9,28 e 6,72 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$ e limites de detecção de 2,47; 1,37 e 1,86 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram verificados para os eletrodos EPC, EPCM-NTC e EPCM-N2, respectivamente. Para as determinações de 4-EC e 4-EG, o EPCM-N2 apresentou melhor desempenho analítico com sensibilidades de 18,7 e 35,9 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$ e limites de detecção de 86,3 e 93,7 nmol L^{-1} , respectivamente. Considerando a diferença entre as sensibilidades obtidas para eletrodos e analitos, é possível supor que o arranjo de eletrodos de pasta de carbono possa ser adequado para realizar a discriminação dos compostos fenólicos, para construir e prever o modelo de resposta.

4.6.5 Análise de Componentes Principais

Para confirmar se o arranjo de sensores proposto seria capaz de realizar a identificação dos compostos fenólicos, os dados voltamétricos obtidos pelas curvas analíticas foram verificados a partir de análises de componentes principais (PCA). Com isso, foram obtidos os gráficos de PCA em relação aos *scores* e aos pesos (*loadings*), conforme apresentados na FIGURA 79.

FIGURA 79 – GRÁFICOS DE *SCORES* (A) E *LOADINGS* (B) OBTIDOS A PARTIR DE ANÁLISE DE PCA DAS DUAS PRIMEIRAS COMPONENTES (PC1 E PC2), PARA OS COMPOSTOS CATECOL, 4-ETILCATECOL E 4-ETILGUAICOL, EMPREGANDO OS ELETRODOS EPC, EPCM-NTC E EPCM-N2 (N=3)



Primeiramente, observou-se que a primeira componente principal (PC1) levou em conta a maioria das informações obtidas (96,9 %), sendo que para as duas primeiras componentes, a variância explicada acumulada chegou a 100 %, indicando que a variância contida na informação original pode ser representada apenas pelas duas primeiras coordenadas. Os dados obtidos mostraram uma relativa dispersão em relação aos diferentes quadrantes, isso sugere que cada sensor apresentou desempenho distinto para a detecção dos compostos, esta é uma condição desejável para a aplicação dos sensores na ET.

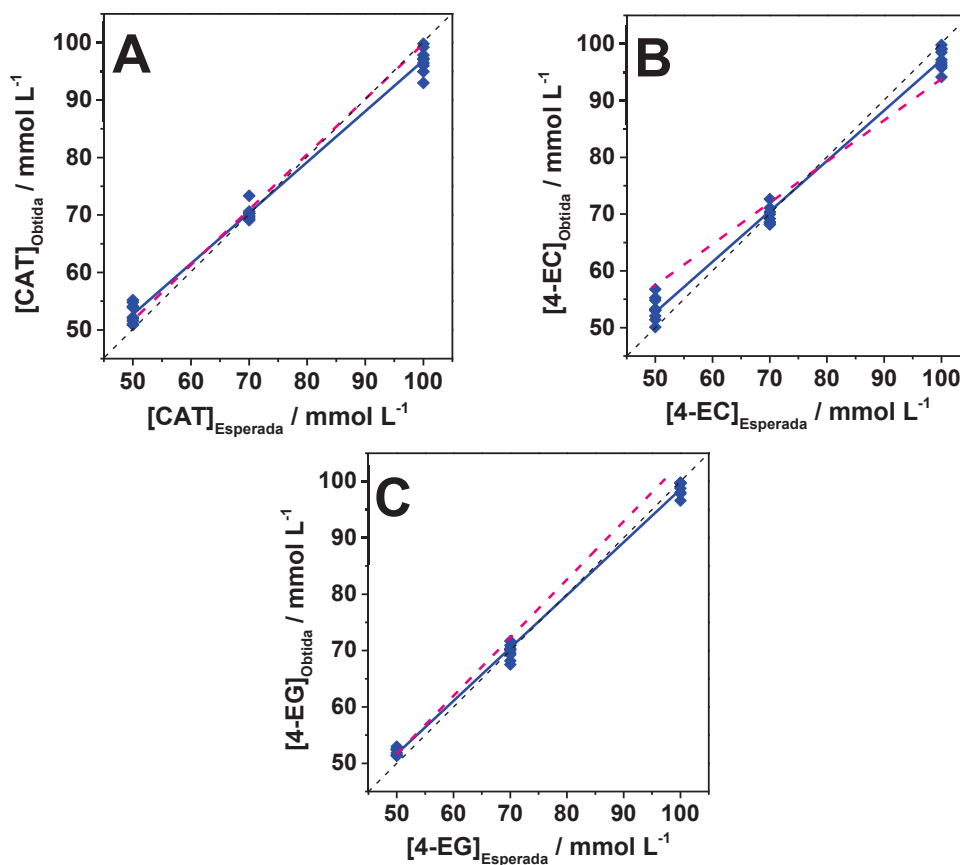
Confrontando os gráficos de *scores* e de *loadings*, foi possível prever as relações entre a discriminação e detecção dos compostos fenólicos pelos sensores empregados. Notou-se que os dados gerados para o catecol, por exemplo, se encontram no quadrante respectivo ao EPCM-NTC. Isso significa que este composto apresenta sinais e padrões característicos e que são melhor discriminados por este sensor [140]. Além disso, o EPCM-N2 apresentou maior

capacidade para discriminar o composto 4-EC e o EPC para o 4-EG. Tais resultados são comparáveis e concordantes com o desempenho analítico apresentado por estes sensores, conforme mostrado anteriormente na TABELA 28. Assim, foi possível concluir que os eletrodos apresentaram capacidade de discriminar as espécies avaliadas, viabilizando a aplicação da língua eletrônica para este método.

4.6.6 Aplicação da Língua Eletrônica Voltamétrica

Em seguida, foi feita a modelagem dos dados, empregando o modelo de ANNs, que foi mais adequado ao sistema proposto. Este modelo foi construído por um subconjunto de treinamento e o seu desempenho foi avaliado por um subconjunto de teste, para três compostos fenólicos nas concentrações previstas ($5,0 \times 10^{-5}$, $7,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). A FIGURA 80 mostra a relação de concentrações previstas e esperadas para os três analitos.

FIGURA 80 – MODELAGENS OBTIDAS POR ANN PARA AS CONCENTRAÇÕES ESPERADAS E OBTIDAS COM O CONJUNTO DE TREINAMENTO (♦) E DE TESTE (---) PARA O CATECHOL (A), 4-ETILCATECOL (B) E 4-ETILGUAIACOL (C). LINHA TEÓRICA (---)



Para o subconjunto de treinamento, obteve-se uma tendência satisfatória, com uma regressão linear (linha sólida azul) muito semelhante à linha teórica, representada pela linha tracejada preta ($R^2 = 1,000$). Isso pode ser observado a partir dos valores de coeficientes de correlação obtidos, que apresentaram $R^2 > 0,9940$, para os compostos fenólicos avaliados. Paralelo a isso, os valores de sensibilidade também foram considerados satisfatórios, sendo que para este subconjunto a quantificação de 4-EG apresentou maior sensibilidade e também valores de concentração obtidos mais próximos aos valores esperados. Os resultados de regressão linear obtidos a partir da aplicação da língua eletrônica, utilizando ANN, podem ser visualizados a seguir na TABELA 29.

TABELA 29 – RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA APLICAÇÃO DA LÍNGUA ELETRÔNICA COM O MODELO DE ANN PARA OS SUBCONJUNTOS DE TREINAMENTO E DE TESTE EM RELAÇÃO AOS COMPOSTOS FENÓLICOS AVALIADOS

| Composto Fenólico | R^2 | Sensibilidade ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$) | Intercept ($\mu\text{mol L}^{-1}$) |
|-----------------------------------|--------|--|---|
| Subconjunto de Treinamento | | | |
| CAT | 0,9940 | 0,880 \pm 0,157 | 8,77 \pm 1,19 |
| 4-EC | 0,9978 | 0,885 \pm 0,0371 | 8,58 \pm 2,72 |
| 4-EG | 0,9987 | 0,938 \pm 0,0220 | 4,80 \pm 1,72 |
| Subconjunto de Teste | | | |
| CAT | 0,8672 | 0,972 \pm 0,0750 | 3,08 \pm 2,16 |
| 4-EC | 0,8292 | 0,713 \pm 0,142 | 2,22 \pm 1,56 |
| 4-EG | 0,9898 | 0,966 \pm 0,0411 | 5,82 \pm 3,57 |

Para o subconjunto de teste, os pontos obtidos deram origem à linha tracejada, cujos resultados lineares também foram considerados aceitáveis no intervalo de concentração avaliado, com $R^2 > 0,9898$. Estes coeficientes de correlação mais baixos em relação ao conjunto de treinamento podem estar relacionados às medições aleatórias realizadas, contudo, foram considerados consistentes com as concentrações esperadas e obtidas. Este subconjunto também é utilizado para validação e comparação externa do método [352]. Neste sentido, o método não foi aplicado para a determinação em amostras reais, porém, de acordo com os resultados obtidos, pode-se prever que este apresenta potencialidade analítica para tal aplicação.

4.6.7 Conclusões Parciais para a Determinação de Compostos Fenólicos empregando uma Língua Eletrônica Voltamétrica

Nesta última etapa avaliou-se a aplicabilidade de um EPCM-N2 no desenvolvimento de uma língua eletrônica voltamétrica para a distinção e determinação de compostos fenólicos. O arranjo de sensores foi composto por eletrodos de pasta de carbono constituídos de diferentes formas de carbono. Curvas analíticas foram obtidas após a pré-concentração espontânea dos compostos fenólicos, e apresentaram amplas faixas de região linear, e distinções entre as sensibilidades e os perfis voltamétricos. Estes dados foram analisados qualitativamente por PCA, em que a variância contida na informação original pode ser representada apenas pelas duas primeiras coordenadas, sendo possível a discriminação dos compostos avaliados e viabilizando a aplicação da língua eletrônica para esta estratégia. A ET foi aplicada em três níveis de concentração para os três compostos fenólicos, e a modelagem quantitativa de dados foi realizada utilizando redes neurais artificiais. O arranjo de sensores proposto apresentou potencialidade analítica permitindo a distinção e determinação de CAT, 4-EC e 4-EG utilizando processamentos quimiométricos. Considerou-se que o método mostrou resultados satisfatórios em relação a reprodutibilidade, sensibilidade e linearidade, tanto para o subconjunto de treinamento, quanto de teste. Assim, pode-se concluir que a estratégia proposta permitiu a aplicação de um EPCM com biochar ativado em conjunto com outros EPC, em uma língua eletrônica voltamétrica.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram investigadas diferentes estratégias de ativação de biochar com HNO_3 e/ou H_2O_2 . Foram observadas que os diferentes tratamentos químicos de ativação acarretaram em variações das propriedades físico-químicas destes materiais, principalmente em relação a características morfológicas e estruturais. A amostra de biochar ativado N2 (tratada com HNO_3 50 % (v/v), a 60 °C por 3,0 h) se destacou por apresentar maior quantidade de defeitos superficiais, promovidos pela maior quantidade de grupamentos funcionais oxigenados. Isso promoveu a melhor capacidade de pré-concentração e quantificação de espécies orgânicas e inorgânicas avaliadas, empregando o EPCM-N2 em comparação a outros eletrodos modificados com amostras de biochar precursor e ativadas. Esta amostra foi então empregada para o desenvolvimento das demais estratégias abordadas neste trabalho.

Um método analítico alternativo foi desenvolvido para a determinação de íons Ni(II), monitorando o par redox Ni(II)/Ni(III) em meio básico. As interações entre o biocarvão e o analito ocorrem, principalmente, nos sítios oxigenados do carbonáceo e possibilitam a pré-concentração do cátion Ni(II). A determinação foi realizada em solução alcalina empregando o sinal Ni(II)/Ni(III) sem a necessidade de se utilizar agentes complexantes. O método proposto foi aplicado com sucesso para a determinação de íons Ni(II) em amostras fortificadas de etanol combustível e água residuária

Neste mesmo contexto, o eletrodo proposto foi também avaliado na pré-concentração e determinação de uma espécie orgânica, o ácido cafeico. Este dispositivo também apresentou resultados efetivos em comparação a outros eletrodos demonstrando que a superfície modificada oferece um ambiente adequado para acumulação do analito por possibilitar interações de hidrogênio com os grupos fenólicos, interações do tipo π - π entre o anel aromático e a superfície do modificador, e possíveis interações eletrostáticas originadas das cargas superficiais positivas e no ácido cafeico desprotonado em solução. Esse efeito permitiu a determinação do composto fenólico com boa sensibilidade e detectabilidade. O método analítico foi aplicado na determinação de ácido cafeico em amostras naturais e fortificadas de vinhos branco, rosé e tinto, e apresentou bons valores de recuperação. Além disso, foi comparado ao método espectroscópico, sendo obtidas razões semelhantes entre as determinações para

cada tipo de vinho, o que sugere que a quantificação de ácido cafeico poderia ser utilizada para indicar a quantidade de compostos fenólicos totais nesta matriz.

Um excelente desempenho analítico foi encontrado com o eletrodo contendo níquel e biochar na determinação não-enzimática de glicose. Nessa etapa, o eletrodo modificado foi combinado com um dispositivo μ TED que é de fácil construção e utiliza materiais de baixo custo. O sistema microfluídico apresentou baixo consumo de reagentes e insumos, baixo volume de injeção e frequência analítica comparável a outros dispositivos microfluídicos relatados na literatura. Além disso, o método pode ser considerado “Excelente” na classificação de métodos verdes, pelo cálculo da Eco-Escala. O EPCM-N2-Ni acoplado ao sistema μ TED apresentou elevada potencialidade de aplicação para a determinação de glicose em amostras de fluídos biológicos de saliva e soro sanguíneo, evidenciando a viabilidade do método verde proposto e também seu caráter inovador.

A potencialidade do biochar ativado em ancorar espécies biológicas também foi avaliada visando o desenvolvimento de um biossensor baseado no EPCM-N2 com azul da Prússia e enzima GOx imobilizados superficialmente. O dispositivo mostrou-se resultados satisfatórios, com boa afinidade enzima-substrato, reprodutibilidade, sensibilidade e detectabilidade. O método foi também aplicado na determinação amperométrica de glicose em amostras reais e fortificadas de saliva e soro sanguíneo, apresentando bons resultados de recuperação.

Por fim, o EPCM-N2 em conjunto com um EPC e EPCM-BC, foram aplicados em uma língua eletrônica voltamétrica, visando a pré-concentração e determinação de catecol, 4-etilcatecol e 4-etilguaiacol. Os sensores apresentaram bons resultados em relação a região linear de trabalho, sensibilidade, detectabilidade e reprodutibilidade. Além disso, diferenciações entre as sensibilidades, os perfil voltamétricos obtidos para os compostos, e os resultados obtidos por PCA permitiram prever a aplicação do arranjo de sensores na língua eletrônica. Assim, os sensores apresentaram capacidade de distinguir e determinar os três compostos fenólicos, com boa linearidade entre as concentrações esperadas e obtidas, para os subconjuntos de treinamento e de teste.

REFERÊNCIAS

- [1] LEHMANN, J.; JOSEPH, S. *Biochar for environmental management: science and technology*. Routledge: London, 2012.
- [2] LEHMANN, J.; GAUNT, J.; RONDON, M. Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems—a review. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 11, 2, p.395-419, 2006.
- [3] HARRIS, P. On charcoal. *Interdisciplinary Science Reviews*, 24, 4, p.301-306, 1999.
- [4] LEHMANN, J.; RILLIG, M. C.; THIES, J.; MASIELLO, C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D. Biochar effects on soil biota—a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 9, p.1812-1836, 2011.
- [5] REZENDE, E. I. P. D.; MANGONI, A. P.; MANGRICH, A. S.; MESSERSCHMIDT, I.; NOVOTNY, E. H.; VELLOSO, M. H. Preparation of biochar imitating the black lands of indians from Amazon, in *Anais da 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia, 2010.
- [6] MANGRICH, A. S.; MAIA, C. M.; NOVOTNY, E. H. Biocarvão: as terras pretas de índios e o sequestro de carbono. *Revista Ciência Hoje*, 47, p.47-52, 2011.
- [7] TAN, X.; LIU, Y.; ZENG, G.; WANG, X.; HU, X.; GU, Y.; YANG, Z. Application of biochar for the removal of pollutants from aqueous solutions. *Chemosphere*, 125, p.70-85, 2015.
- [8] TRIPATHI, M.; SAHU, J. N.; GANESAN, P. Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste through pyrolysis: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, p.467-481, 2016.
- [9] NOVAK, J. M.; LIMA, I.; XING, B.; GASKIN, J. W.; STEINER, C.; DAS, K.; AHMEDNA, M.; REHRAH, D.; WATTS, D. W.; BUSSCHER, W. J. Characterization of designer biochar produced at different temperatures and their effects on a loamy sand. *Annals of Environmental Science*, 3, 1, p.2, 2009.
- [10] SONG, X.; LIU, H.; CHENG, L.; QU, Y. Surface modification of coconut-based activated carbon by liquid-phase oxidation and its effects on lead ion adsorption. *Desalination*, 255, 1–3, p.78-83, 2010.
- [11] AL-WABEL, M. I.; AL-OMRAN, A.; EL-NAGGAR, A. H.; NADEEM, M.; USMAN, A. R. Pyrolysis temperature induced changes in characteristics and chemical composition of biochar produced from conocarpus wastes. *Bioresource Technology*, 131, p.374-379, 2013.
- [12] UCHIMIYA, M.; WARTELLE, L. H.; KLASSON, K. T.; FORTIER, C. A.; LIMA, I. M. Influence of pyrolysis temperature on biochar property and function as a heavy metal sorbent in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6, p.2501-2510, 2011.
- [13] CANTRELL, K. B.; HUNT, P. G.; UCHIMIYA, M.; NOVAK, J. M.; RO, K. S. Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. *Bioresource Technology*, 107, p.419-428, 2012.
- [14] MAŠEK, O.; BROWNSORT, P.; CROSS, A.; SOHI, S. Influence of production conditions on the yield and environmental stability of biochar. *Fuel*, 103, p.151-155, 2011.
- [15] FANG, Y.; SINGH, B. P.; SINGH, B. Temperature sensitivity of biochar and native carbon mineralisation in biochar-amended soils. *Agriculture, ecosystems & environment*, 191, p.158-167, 2014.
- [16] BRUUN, E. W.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; IBRAHIM, N.; EGSGAARD, H.; AMBUS, P.; JENSEN, P. A.; DAM-JOHANSEN, K. Influence of fast pyrolysis temperature on biochar labile fraction and short-term carbon loss in a loamy soil. *Biomass and Bioenergy*, 35, 3, p.1182-1189, 2011.
- [17] BREWER, C. E.; SCHMIDT-ROHR, K.; SATRIO, J. A.; BROWN, R. C. Characterization of biochar from fast pyrolysis and gasification systems. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 28, 3, p.386-396, 2009.
-

- [18] HILIOU, Z.; MICHAÏLOF, C.; VALASIADIS, D.; ILIOPOULOU, E.; KOIDOU, V.; LAPPAS, A. Characterization of castor plant-derived biochars and their effects as soil amendments on seedlings. *Biomass and Bioenergy*, 105, p.96-106, 2017.
- [19] SILVA, R. V. S.; CASILLI, A.; SAMPAIO, A. L.; ÁVILA, B. M. F.; VELOSO, M. C. C.; AZEVEDO, D. A.; ROMEIRO, G. A. The analytical characterization of castor seed cake pyrolysis bio-oils by using comprehensive GC coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 106, p.152-159, 2014.
- [20] SÁNCHEZ-CANTÚ, M.; JANEIRO-CORONEL, V.; GALICIA-AGUILAR, J.; SANTAMARÍA-JUÁREZ, J. Effect of the activation temperature over activated carbon production from castor cake and its evaluation as dye adsorbent. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15, 7, p.1521-1530, 2018.
- [21] IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>>. Acessado em: 10 de fevereiro de 2019.
- [22] ANANDAN, S.; KUMAR, G. A.; GHOSH, J.; RAMACHANDRA, K. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. *Animal feed science and technology*, 120, 1-2, p.159-168, 2005.
- [23] OGUNNIYI, D. S. Castor oil: a vital industrial raw material. *Bioresource Technology*, 97, 9, p.1086-1091, 2006.
- [24] BRADBERRY, S. M.; DICKERS, K. J.; RICE, P.; GRIFFITHS, G. D.; VALE, J. A. Ricin Poisoning. *Toxicological Reviews*, 22, 1, p.65-70, 2003.
- [25] CHACÓN, F. J.; CAYUELA, M. L.; ROIG, A.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A. Understanding, measuring and tuning the electrochemical properties of biochar for environmental applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 16, 4, p.695-715, 2017.
- [26] REZENDE, E. I.; ANGELO, L. C.; DOS SANTOS, S. S.; MANGRICH, A. S. Biocarvão (Biochar) e Sequestro de Carbono. *Revista Virtual de Química*, 3, 5, p.426-433, 2011.
- [27] YU, X.-Y.; YING, G.-G.; KOOKANA, R. S. Reduced plant uptake of pesticides with biochar additions to soil. *Chemosphere*, 76, 5, p.665-671, 2009.
- [28] TRAKAL, L.; KOMÁREK, M.; SZÁKOVÁ, J.; ZEMANOVÁ, V.; TLUSTOŠ, P. Biochar application to metal-contaminated soil: evaluating of Cd, Cu, Pb and Zn sorption behavior using single-and multi-element sorption experiment. *Plant Soil Environmental*, 57, 8, p.372-380, 2011.
- [29] CAO, X.; MA, L.; LIANG, Y.; GAO, B.; HARRIS, W. Simultaneous immobilization of lead and atrazine in contaminated soils using dairy-manure biochar. *Environmental Science & Technology*, 45, 11, p.4884-4889, 2011.
- [30] DOUMER, M.; RIGOL, A.; VIDAL, M.; MANGRICH, A. Removal of Cd, Cu, Pb, and Zn from aqueous solutions by biochars. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 3, p.2684-2692, 2016.
- [31] TSAI, W.-T.; CHEN, H.-R. Adsorption kinetics of herbicide paraquat in aqueous solution onto a low-cost adsorbent, swine-manure-derived biochar. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10, 6, p.1349-1356, 2013.
- [32] KHORRAM, M. S.; ZHANG, Q.; LIN, D.; ZHENG, Y.; FANG, H.; YU, Y. Biochar: A review of its impact on pesticide behavior in soil environments and its potential applications. *Journal of Environmental Sciences*, 44, p.269-279, 2016.
- [33] AHMAD, M.; RAJAPAKSHA, A. U.; LIM, J. E.; ZHANG, M.; BOLAN, N.; MOHAN, D.; VITHANAGE, M.; LEE, S. S.; OK, Y. S. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. *Chemosphere*, 99, p.19-33, 2014.
- [34] BEESLEY, L.; MORENO-JIMÉNEZ, E.; GOMEZ-EYLES, J. L. Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environmental Pollution*, 158, 6, p.2282-2287, 2010.

- [35] AHMAD, M.; LEE, S. S.; DOU, X.; MOHAN, D.; SUNG, J.-K.; YANG, J. E.; OK, Y. S. Effects of pyrolysis temperature on soybean stover-and peanut shell-derived biochar properties and TCE adsorption in water. *Bioresource Technology*, 118, p.536-544, 2012.
- [36] CARRIER, M.; HUGO, T.; GORGENS, J.; KNOETZE, H. Comparison of slow and vacuum pyrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 90, 1, p.18-26, 2011.
- [37] JARAMILLO, J.; GÓMEZ-SERRANO, V.; ÁLVAREZ, P. M. Enhanced adsorption of metal ions onto functionalized granular activated carbons prepared from cherry stones. *Journal of Hazardous Materials*, 161, p.670-676, 2009.
- [38] FAN, Y.; WANG, B.; YUAN, S.; WU, X.; CHEN, J.; WANG, L. Adsorptive removal of chloramphenicol from wastewater by NaOH modified bamboo charcoal. *Bioresource Technology*, 101, 19, p.7661-7664, 2010.
- [39] JUNG, C.; BOATENG, L. K.; FLORA, J. R.; OH, J.; BRASWELL, M. C.; SON, A.; YOON, Y. Competitive adsorption of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs on activated biochars: Experimental and molecular modeling study. *Chemical Engineering Journal*, 264, p.1-9, 2015.
- [40] XUE, Y.; GAO, B.; YAO, Y.; INYANG, M.; ZHANG, M.; ZIMMERMAN, A. R.; RO, K. S. Hydrogen peroxide modification enhances the ability of biochar (hydrochar) produced from hydrothermal carbonization of peanut hull to remove aqueous heavy metals: Batch and column tests. *Chemical Engineering Journal*, 200–202, p.673-680, 2012.
- [41] LIU, P.; LIU, W.-J.; JIANG, H.; CHEN, J.-J.; LI, W.-W.; YU, H.-Q. Modification of biochar derived from fast pyrolysis of biomass and its application in removal of tetracycline from aqueous solution. *Bioresource Technology*, 121, p.235-240, 2012.
- [42] LI, Y.; SHAO, J.; WANG, X.; DENG, Y.; YANG, H.; CHEN, H. Characterization of modified biochars derived from bamboo pyrolysis and their utilization for target component (furfural) adsorption. *Energy & Fuels*, 28, 8, p.5119-5127, 2014.
- [43] JIN, H.; CAPAREDA, S.; CHANG, Z.; GAO, J.; XU, Y.; ZHANG, J. Biochar pyrolytically produced from municipal solid wastes for aqueous As(V) removal: Adsorption property and its improvement with KOH activation. *Bioresource Technology*, 169, p.622-629, 2014.
- [44] RAJAPAKSHA, A. U.; CHEN, S. S.; TSANG, D. C.; ZHANG, M.; VITHANAGE, M.; MANDAL, S.; GAO, B.; BOLAN, N. S.; OK, Y. S. Engineered/designer biochar for contaminant removal/immobilization from soil and water: Potential and implication of biochar modification. *Chemosphere*, 148, p.276-291, 2016.
- [45] YIN, C. Y.; AROUA, M. K.; DAUD, W. M. A. W. Review of modifications of activated carbon for enhancing contaminant uptakes from aqueous solutions. *Separation and Purification Technology*, 52, 3, p.403-415, 2007.
- [46] BAZUŁA, P. A.; LU, A.-H.; NITZ, J.-J.; SCHÜTH, F. Surface and pore structure modification of ordered mesoporous carbons via a chemical oxidation approach. *Microporous and Mesoporous Materials*, 108, p.266-275, 2008.
- [47] ESTUPIÑAN, P. R.; GIRALDO, L.; MORENO, J. C. Activated carbon surface oxidation by HNO₃ and H₂O₂: Effect on the removal of nickel (II) from aqueous solution. *Revista Colombiana de Química*, 40, 3, p.349-364, 2011.
- [48] ANGELO, L. C.; MANGRICH, A. S.; MANTOVANI, K. M.; DOS SANTOS, S. S. Loading of VO²⁺ and Cu²⁺ to partially oxidized charcoal fines rejected from Brazilian metallurgical industry. *Journal of soils and sediments*, 14, 2, p.353-359, 2014.
- [49] DAUD, W. M. A. W.; HOUSHAMND, A. H. Textural characteristics, surface chemistry and oxidation of activated carbon. *Journal of Natural Gas Chemistry*, 19, 3, p.267-279, 2010.
- [50] BRENNAN, J. K.; BANDOSZ, T. J.; THOMSON, K. T.; GUBBINS, K. E. Water in porous carbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 187–188, p.539-568, 2001.
- [51] CARMO, D. R. D.; SILVA, R. M. D.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical and voltammetric determination of sulfhydryl compounds through iron nitroprusside modified

- graphite paste electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14, 4, p.616-620, 2003.
- [52] WANG, J. *Analytical electrochemistry*. 3 ed. Wiley-VCH: New York, 2006.
- [53] PEREIRA, A. C.; DE SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, 25, 6/A, p.1012-1021, 2002.
- [54] ADAMS, R. N. *Electrochemistry at solid electrodes*. Marcel Dekker: New York, 1969.
- [55] ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; BAREK, J.; ZIMA, J. Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31, 4, p.311-345, 2001.
- [56] VYTRÁS, K.; ŠVANCARA, I.; METELKA, R. Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74, 10, p.1021-1033, 2009.
- [57] SUGUIHIRO, T. M.; DE OLIVEIRA, P. R.; DE REZENDE, E. I. P.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. An electroanalytical approach for evaluation of biochar adsorption characteristics and its application for lead and cadmium determination. *Bioresource Technology*, 143, p.40-45, 2013.
- [58] LIU, G.; LI, L.; ZHANG, K.; WANG, X.; CHANG, J.; SHENG, Y.; BAI, L.; WEN, Y. Facile Preparation of Water-processable Biochar Based on Pitch Pine and Its Electrochemical Application for Cadmium Ion Sensing. *Int. J. Electrochem. Sci*, 11, p.1041-1054, 2016.
- [59] OLIVEIRA, P. R.; LAMY-MENDES, A. C.; REZENDE, E. I. P.; MANGRICH, A. S.; JUNIOR, L. H. M.; BERGAMINI, M. F. Electrochemical determination of copper ions in spirit drinks using carbon paste electrode modified with biochar. *Food Chemistry*, 171, p.426-431, 2015.
- [60] KALINKE, C.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Carbon Paste Electrode Modified with Biochar for Sensitive Electrochemical Determination of Paraquat. *Electroanalysis*, 28, p.764-769, 2015.
- [61] OLIVEIRA, P. R.; KALINKE, C.; GOGOLA, J. L.; MANGRICH, A. S.; JUNIOR, L. H. M.; BERGAMINI, M. F. The use of activated biochar for development of a sensitive electrochemical sensor for determination of methyl parathion. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 799, p.602-608, 2017.
- [62] FERREIRA, P. A.; BACKES, R.; MARTINS, C. A.; DE CARVALHO, C. T.; DA SILVA, R. A. B. Biochar: A Low-cost Electrode Modifier for Electrocatalytic, Sensitive and Selective Detection of Similar Organic Compounds. *Electroanalysis*, 30, 10, p.2233-2236, 2018.
- [63] AGUSTINI, D.; MANGRICH, A. S.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Sensitive voltammetric determination of lead released from ceramic dishes by using of bismuth nanostructures anchored on biochar. *Talanta*, 142, p.221-227, 2015.
- [64] OLIVEIRA, P. R.; LAMY-MENDES, A. C.; GOGOLA, J. L.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Mercury nanodroplets supported at biochar for electrochemical determination of zinc ions using a carbon paste electrode. *Electrochimica Acta*, 151, p.525-530, 2015.
- [65] XIANG, Y.; LIU, H.; YANG, J.; SHI, Z.; TAN, Y.; JIN, J.; WANG, R.; ZHANG, S.; WANG, J. Biochar decorated with gold nanoparticles for electrochemical sensing application. *Electrochimica Acta*, 261, p.464-473, 2018.
- [66] DE OLIVEIRA, P. R.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Flow injection amperometric determination of isoniazid using a screen-printed carbon electrode modified with silver hexacyanoferrates nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171, p.795-802, 2012.
- [67] NOSSOL, E.; ZARBIN, A. J. A simple and innovative route to prepare a novel carbon nanotube/prussian blue electrode and its utilization as a highly sensitive H₂O₂ amperometric sensor. *Advanced Functional Materials*, 19, 24, p.3980-3986, 2009.
- [68] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical methods: principles and applications*. *Electrochemical Methods: Principles and Applications*, p.386-428, 2001.

- [69] OJANI, R.; RAOOF, J. B.; FATHI, S. Electrocatalytic oxidation of some carbohydrates by nickel/poly (o-aminophenol) modified carbon paste electrode. *Electroanalysis*, 20, 16, p.1825-1830, 2008.
- [70] WANG, L.; TRICARD, S.; YUE, P. W.; ZHAO, J. H.; FANG, J.; SHEN, W. G. Polypyrrole and graphene quantum dots @ Prussian Blue hybrid film on graphite felt electrodes: Application for amperometric determination of L-cysteine. *Biosens. Bioelectron.*, 77, p.1112-1118, 2016.
- [71] BILLONES, J. B.; RATILLA, E. M. A.; HEATH, G. A. Variation of electrode potential and charge transfer bands in series of tetravalent ruthenium complexes [RuCl₆- n (PrCN) n] n- 2. *Inorganica chimica acta*, 429, p.209-215, 2015.
- [72] KARYAKIN, A. A. Prussian blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications. *Electroanalysis*, 13, 10, p.813-819, 2001.
- [73] MEENAKSHI, S.; PANDIAN, K.; JAYAKUMARI, L.; INBASEKARAN, S. Enhanced amperometric detection of metronidazole in drug formulations and urine samples based on chitosan protected tetrasulfonated copper phthalocyanine thin-film modified glassy carbon electrode. *Materials Science and Engineering: C*, 59, p.136-144, 2016.
- [74] BERNALTE, E.; SÁNCHEZ, C. M.; GIL, E. P. Determination of mercury in ambient water samples by anodic stripping voltammetry on screen-printed gold electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 689, 1, p.60-64, 2011.
- [75] ENSAFI, A. A.; AHMADI, N.; REZAEI, B. Nickel nanoparticles supported on porous silicon flour, application as a non-enzymatic electrochemical glucose sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 239, p.807-815, 2017.
- [76] FLEISCHMANN, M.; KORINEK, K.; PLETCHER, D. The oxidation of organic compounds at a nickel anode in alkaline solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 31, 1, p.39-49, 1971.
- [77] BARBOSA, A. F. B.; OLIVEIRA, V. L.; VAN DRUNEN, J.; TREMILIOSI-FILHO, G. Ethanol electro-oxidation reaction using a polycrystalline nickel electrode in alkaline media: Temperature influence and reaction mechanism. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 746, p.31-38, 2015.
- [78] RAOOF, J. B.; AZIZI, N.; OJANI, R.; GHODRATI, S.; ABRISHAMKAR, M.; CHEKIN, F. Synthesis of ZSM-5 zeolite: Electrochemical behavior of carbon paste electrode modified with Ni(II) zeolite and its application for electrocatalytic oxidation of methanol. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 20, p.13295-13300, 2011.
- [79] STRADIOTTO, N. R.; TOGHILL, K. E.; XIAO, L.; MOSHAR, A.; COMPTON, R. G. The fabrication and characterization of a nickel nanoparticle modified boron doped diamond electrode for electrocatalysis of primary alcohol oxidation. *Electroanalysis*, 21, 24, p.2627-2633, 2009.
- [80] HUTTON, L. A.; VIDOTTI, M.; PATEL, A. N.; NEWTON, M. E.; UNWIN, P. R.; MACPHERSON, J. V. Electrodeposition of nickel hydroxide nanoparticles on boron-doped diamond electrodes for oxidative electrocatalysis. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115, 5, p.1649-1658, 2010.
- [81] WANG, B.; LI, S.; LIU, J.; YU, M. Preparation of nickel nanoparticle/graphene composites for non-enzymatic electrochemical glucose biosensor applications. *Materials Research Bulletin*, 49, p.521-524, 2014.
- [82] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. *Electroanalysis*. Chemistry Primer: Oxford, 1998.
- [83] SAFAVI, A.; MALEKI, N.; FARJAMI, E. Fabrication of a glucose sensor based on a novel nanocomposite electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 6, p.1655-1660, 2009.
- [84] JIA, D.; LI, F.; SHENG, L.; REN, Q.; DONG, S.; XU, S.; MU, Y.; MIAO, Y. Synthesis and assembly of ultrathin film of Ni(OH)₂ nanoparticles at gas/liquid interface, its high electrocatalytical oxidation toward bio-thiols and selective determination of cysteine. *Electrochemistry Communications*, 13, 10, p.1119-1122, 2011.
- [85] VIDOTTI, M.; TORRESI, R.; DE TORRESI, S. I. C. Eletrodos modificados por hidróxido de níquel: um estudo de revisão sobre suas propriedades estruturais e

eletroquímicas visando suas aplicações em eletrocatalise, eletrocromismo e baterias secundárias. *Química Nova*, 33, 10, p.2176-2186, 2010.

[86] BODE, H.; DEHMELT, K.; WITTE, J. Zur kenntnis der nickelhydroxidelektrode—I. Über das nickel (II)-hydroxidhydrat. *Electrochimica Acta*, 11, 8, p.1079-1087, 1966.

[87] ACHARYA, R.; SUBBAIAH, T.; ANAND, S.; DAS, R. Preparation, characterization and electrolytic behavior of β -nickel hydroxide. *Journal of Power Sources*, 109, 2, p.494-499, 2002.

[88] VIDOTTI, M.; DE TORRESI, S. I. C.; KUBOTA, L. T. Electrochemical oxidation of glycine by doped nickel hydroxide modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 135, 1, p.245-249, 2008.

[89] KO, C.-Y.; HUANG, J.-H.; RAINA, S.; KANG, W. P. A high performance non-enzymatic glucose sensor based on nickel hydroxide modified nitrogen-incorporated nanodiamonds. *Analyst*, 138, 11, p.3201-3208, 2013.

[90] JIANG, D.; CHU, Z.; PENG, J.; JIN, W. Screen-printed biosensor chips with Prussian blue nanocubes for the detection of physiological analytes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228, p.679-687, 2016.

[91] MANIVANNAN, S.; KANG, I.; KIM, K. In situ growth of Prussian blue nanostructures at reduced graphene oxide as a modified platinum electrode for synergistic methanol oxidation. *Langmuir*, 32, 7, p.1890-1898, 2016.

[92] ALAMINI, M. F.; DA SILVA, R.; ZOLDAN, V.; ISOPPO, E.; RODRIGUES FILHO, U.; REIS, F. A.; KLEIN, A.; PASA, A. Normal versus anomalous roughening in electrodeposited Prussian Blue layers. *Electrochemistry Communications*, 13, 12, p.1455-1458, 2011.

[93] SOUZA, F. S. D. Sensores amperométricos nanoestruturados para determinação de H_2O_2 em amostras de uso cosmético e de higiene pessoal. *Tese de doutorado*. Universidade Federal de Santa Catarina: 2015.

[94] PINTADO, S.; GOBERNA-FERRÓN, S.; ESCUDERO-ADÁN, E. C.; GALÁN-MASCARÓS, J. R. N. Fast and persistent electrocatalytic water oxidation by Co-Fe Prussian blue coordination polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 36, p.13270-13273, 2013.

[95] LIU, X.; NAN, Z.; QIU, Y.; ZHENG, L.; LU, X. Hydrophobic ionic liquid immobilizing cholesterol oxidase on the electrodeposited Prussian blue on glassy carbon electrode for detection of cholesterol. *Electrochimica Acta*, 90, p.203-209, 2013.

[96] KONG, B.; SELOMULYA, C.; ZHENG, G.; ZHAO, D. New faces of porous Prussian blue: interfacial assembly of integrated hetero-structures for sensing applications. *Chemical Society Reviews*, 44, 22, p.7997-8018, 2015.

[97] ALKIRE, R.; KOLB, D.; LIPKOWSKI, J.; ROSS, P. *Advances in Electrochemical Science and Engineering*. 2009, John Wiley & Sons: Weinheim.

[98] JIA, Z. Synthesis of Prussian Blue nanocrystals with metal complexes as precursors: Quantitative calculations of species distribution and its effects on particles size. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 389, 1-3, p.144-148, 2011.

[99] KOMKOVA, M. A.; KARYAKINA, E. E.; KARYAKIN, A. A. Catalytically synthesized Prussian blue nanoparticles defeating natural enzyme peroxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 140, 36, p.11302-11307, 2018.

[100] DE TACCONI, N. R.; RAJESHWAR, K.; LEZNA, R. O. Metal hexacyanoferrates: electrosynthesis, in situ characterization, and applications. *Chemistry of Materials*, 15, 16, p.3046-3062, 2003.

[101] TOYODA, Y.; KATOH, N.; KUWABARA, K. Dependence of redox characteristics in Prussian blue-modified electrode on pH of electrolytic solution. *Materials Science and Engineering: B*, 108, 3, p.271-277, 2004.

[102] RICCI, F.; PALLESCI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 3, p.389-407, 2005.

- [103] GIMENES, D. T.; NOSSOL, E. Effect of light source and applied potential in the electrochemical synthesis of Prussian blue on carbon nanotubes. *Electrochimica Acta*, 251, p.513-521, 2017.
- [104] PRADELA, L. A.; OLIVEIRA, B. C.; TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L. A Prussian blue-carbon paste electrode for selective cathodic amperometric determination of nitrite using a flow-injection analysis system with carrier recycling. *Electrochim. Acta*, 180, p.939-946, 2015.
- [105] RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39, 5, p.1747-1763, 2010.
- [106] GOODE, J.; DILLON, G.; MILLNER, P. A. The development and optimisation of nanobody based electrochemical immunosensors for IgG. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 234, p.478-484, 2016.
- [107] WILSON, R.; TURNER, A. Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*, 7, 3, p.165-185, 1992.
- [108] JUGOVIĆ, B.; GRGUR, B.; ANTOV, M.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.; STEVANOVIĆ, J.; GVOZDENOVIĆ, M. Polypyrrole-based enzyme electrode with immobilized glucose oxidase for electrochemical determination of glucose. 2016.
- [109] FERNANDES, E. G. R. Biossensores Nanoestruturados para Monitoração de Glicose. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Itajubá: 2005.
- [110] WOHLFAHRT, G.; TRIVIĆ, S.; ZEREMSKI, J.; PERIČIN, D.; LESKOVAC, V. The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Molecular and cellular biochemistry*, 260, 1, p.69-83, 2004.
- [111] VAN STADEN, J. K. F. Application of phthalocyanines in flow-and sequential-injection analysis and microfluidics systems: A review. *Talanta*, 139, p.75-88, 2015.
- [112] TROJANOWICZ, M.; KOŁACIŃSKA, K. Recent advances in flow injection analysis. *Analyst*, 141, 7, p.2085-2139, 2016.
- [113] WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442, 7101, p.368, 2006.
- [114] CARNEIRO, E. A.; AGUSTINI, D.; FIGUEIREDO-FILHO, L.; BANKS, C. E.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. 3D-printed Microfluidic Device Based on Cotton Threads for Amperometric Estimation of Antioxidants in Wine Samples. *Electroanalysis*, 30, 1, p.101-108, 2018.
- [115] BOYD-MOSS, M.; BARATCHI, S.; DI VENERE, M.; KHOSHMANESH, K. Self-contained microfluidic systems: a review. *Lab on a Chip*, 16, 17, p.3177-3192, 2016.
- [116] SUN, X.; WANG, H.; JIAN, Y.; LAN, F.; ZHANG, L.; LIU, H.; GE, S.; YU, J. Ultrasensitive microfluidic paper-based electrochemical/visual biosensor based on spherical-like cerium dioxide catalyst for miR-21 detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 105, p.218-225, 2018.
- [117] ALMEIDA, M. I. G. S.; JAYAWARDANE, B. M.; KOLEV, S. D.; MCKELVIE, I. D. Developments of microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) for water analysis: A review. *Talanta*, 177, p.176-190, 2018.
- [118] ROHRMAN, B. A.; RICHARDS-KORTUM, R. R. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. *Lab on a Chip*, 12, 17, p.3082-3088, 2012.
- [119] TOMAZELLI COLTRO, W. K.; CHENG, C. M.; CARRILHO, E.; JESUS, D. P. Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications. *Electrophoresis*, 35, 16, p.2309-2324, 2014.
- [120] TSAO, C.-W.; DEVOE, D. L. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. *Microfluidics and nanofluidics*, 6, 1, p.1-16, 2009.
- [121] WEI, Y.-C.; FU, L.-M.; LIN, C.-H. Electrophoresis separation and electrochemical detection on a novel thread-based microfluidic device. *Microfluidics and Nanofluidics*, 14, 3-4, p.723-730, 2013.

- [122] AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Low cost microfluidic device based on cotton threads for electroanalytical application. *Lab on a Chip*, 16, 2, p.345-352, 2016.
- [123] NGO, T. D.; KASHANI, A.; IMBALZANO, G.; NGUYEN, K. T. Q.; HUI, D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering*, 143, p.172-196, 2018.
- [124] AMBROSI, A.; PUMERA, M. 3D-printing technologies for electrochemical applications. *Chemical Society Reviews*, 45, 10, p.2740-2755, 2016.
- [125] BRENKEN, B.; BAROCIO, E.; FAVALORO, A.; KUNC, V.; PIPES, R. B. Fused filament fabrication of fiber-reinforced polymers: A review. *Additive Manufacturing*, 21, p.1-16, 2018.
- [126] WANG, X.; JIANG, M.; ZHOU, Z.; GOU, J.; HUI, D. 3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective. *Composites Part B: Engineering*, 110, p.442-458, 2017.
- [127] BUJ-CORRAL, I.; BAGHERI, A.; DOMÍNGUEZ-FERNÁNDEZ, A. Influence of Structure Support Printing Parameters on Surface Finish of PLA Hemispherical Cups for Emulation of Ceramic Hip Prostheses. *Procedia CIRP*, 68, p.347-351, 2018.
- [128] KABIRIAN, F.; DITKOWSKI, B.; ZAMANIAN, A.; HEYING, R.; MOZAFARI, M. An innovative approach towards 3D-printed scaffolds for the next generation of tissue-engineered vascular grafts. *Materials Today: Proceedings*, 5, 7, Part 3, p.15586-15594, 2018.
- [129] GUERRERO-VILLAR, F.; TORRES-JIMENEZ, E.; DORADO-VICENTE, R.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, J. I. Development of Vertical Wind Turbines via FDM Prototypes. *Procedia Engineering*, 132, p.78-85, 2015.
- [130] O'HARA, W. J.; KISH, J. M.; WERKHEISER, M. J. Turn-key use of an onboard 3D printer for international space station operations. *Additive Manufacturing*, 24, p.560-565, 2018.
- [131] DUL, S.; FAMBRI, L.; PEGORETTI, A. Fused deposition modelling with ABS-graphene nanocomposites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 85, p.181-191, 2016.
- [132] LEE, J.-Y.; AN, J.; CHUA, C. K. Fundamentals and applications of 3D printing for novel materials. *Applied Materials Today*, 7, p.120-133, 2017.
- [133] GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, p.78-84, 2013.
- [134] GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z. M.; KONIECZKA, P.; NAMIEŚNIK, J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, 37, p.61-72, 2012.
- [135] PŁOTKA-WASYLKA, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*, 181, p.204-209, 2018.
- [136] CHANDRASHEKAR, J.; HOON, M. A.; RYBA, N. J.; ZUKER, C. S. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444, 7117, p.288, 2006.
- [137] DEL VALLE, M. Electronic tongues employing electrochemical sensors. *Electroanalysis*, 22, 14, p.1539-1555, 2010.
- [138] GHASEMI-VARNAMKHASTI, M.; APETREI, C.; LOZANO, J.; ANYOGU, A. Potential use of electronic noses, electronic tongues and biosensors as multisensor systems for spoilage examination in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 80, p.71-92, 2018.
- [139] TAHARA, Y.; TOKO, K. Electronic tongues—a review. *IEEE Sensors Journal*, 13, 8, p.3001-3011, 2013.
- [140] BRUGNOLLO, E. D.; PATERNO, L. G.; LEITE, F. L.; FONSECA, F. J.; CONSTANTINO, C. J. L.; ANTUNES, P. A.; MATTOSO, L. H. C. Fabrication and characterization of chemical sensors made from nanostructured films of poly(o-

- ethoxyaniline) prepared with different doping acids. *Thin Solid Films*, 516, 10, p.3274-3281, 2008.
- [141] APETREI, C.; GUTIEREZ, F.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M.; DE SAJA, J. Novel method based on carbon paste electrodes for the evaluation of bitterness in extra virgin olive oils. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 121, 2, p.567-575, 2007.
- [142] DE MORAIS, T. C. B.; RODRIGUES, D. R.; SOUTO, U. T. D. C. P.; LEMOS, S. G. A simple voltammetric electronic tongue for the analysis of coffee adulterations. *Food Chemistry*, 273, p.31-38, 2019.
- [143] SHAMSIPUR, M.; TASHKHOURIAN, J.; HEMMATEENEJAD, B.; SHARGHI, H. Application of artificial neural network to simultaneous potentiometric determination of silver(I), mercury(II) and copper(II) ions by an unmodified carbon paste electrode. *Talanta*, 64, 3, p.590-596, 2004.
- [144] HA, D.; SUN, Q.; SU, K.; WAN, H.; LI, H.; XU, N.; SUN, F.; ZHUANG, L.; HU, N.; WANG, P. Recent achievements in electronic tongue and bioelectronic tongue as taste sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207, p.1136-1146, 2015.
- [145] WEI, Z.; YANG, Y.; WANG, J.; ZHANG, W.; REN, Q. The measurement principles, working parameters and configurations of voltammetric electronic tongues and its applications for foodstuff analysis. *Journal of Food Engineering*, 217, p.75-92, 2018.
- [146] PARRA, V.; ARRIETA, Á. A.; FERNÁNDEZ-ESCUADERO, J. A.; ÍÑIGUEZ, M.; DE SAJA, J. A.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L. Monitoring of the ageing of red wines in oak barrels by means of an hybrid electronic tongue. *Analytica chimica acta*, 563, 1-2, p.229-237, 2006.
- [147] ARRIETA, A.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M.; DE SAJA, J. Langmuir–Blodgett film and carbon paste electrodes based on phthalocyanines as sensing units for taste. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 95, 1-3, p.357-365, 2003.
- [148] TIWARI, K.; BISWAS, S.; TUDU, B.; BANDHOPADHYAY, R.; PRAMANIK, P. Development of metal oxide-modified carbon paste based sensor for honey analysis using electronic tongue. *Materials Today: Proceedings*, 4, 9, p.9500-9504, 2017.
- [149] APETREI, C.; RODRIGUEZ-MÉNDEZ, M.; PARRA, V.; GUTIERREZ, F.; DE SAJA, J. Array of voltammetric sensors for the discrimination of bitter solutions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 103, 1-2, p.145-152, 2004.
- [150] LVOVA, L.; KIM, S. S.; LEGIN, A.; VLASOV, Y.; YANG, J. S.; CHA, G. S.; NAM, H. All-solid-state electronic tongue and its application for beverage analysis. *Analytica chimica acta*, 468, 2, p.303-314, 2002.
- [151] WANG, Y. F.; ZHANG, X. R.; YE, Y. C.; LIANG, D. J.; WANG, Y.; WU, K. Self-assemblies of oxovanadium phthalocyanine molecules and nanoclusters on highly oriented pyrolytic graphite. *Wuli Huaxue Xuebao/ Acta Physico - Chimica Sinica*, 26, 4, p.933-938, 2010.
- [152] AGUILAR-LIRA, G. Y.; GUTIÉRREZ-SALGADO, J. M.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A.; RODRÍGUEZ-ÁVILA, J. A.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; ÁLVAREZ-ROMERO, G. A. Voltammetric Determination of Diclofenac in the Presence of Paracetamol and Naproxen by an Artificial Neural Network Model Using a Carbon Paste Electrode. *ECS Transactions*, 84, 1, p.195-205, 2018.
- [153] YU, V.; LEGIN, A.; RUDNITSKAYA, A.; DI NATALE, C.; D'AMICO, A. Nonspecific sensor arrays (electronic tongue) for chemical analysis of liquids. *Pure Appl. Chem*, 77, 11, p.1965-1983, 2005.
- [154] HOLMBERG, M.; ERIKSSON, M.; KRANTZ-RÜLCKER, C.; ARTURSSON, T.; WINQUIST, F.; LLOYD-SPETZ, A.; LUNDSTRÖM, I. 2nd workshop of the second network on artificial olfactory sensing (NOSE II). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 101, 1, p.213-223, 2004.
- [155] RICHARDS, E.; BESSANT, C.; SAINI, S. Multivariate data analysis in electroanalytical chemistry. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 14, 22, p.1533-1542, 2002.
-

- [156] DE SÁ, A. C.; CIPRI, A.; GONZÁLEZ-CALABUIG, A.; STRADIOTTO, N. R.; DEL VALLE, M. Resolution of galactose, glucose, xylose and mannose in sugarcane bagasse employing a voltammetric electronic tongue formed by metals oxy-hydroxide/MWCNT modified electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222, p.645-653, 2016.
- [157] FAURA, G.; GONZÁLEZ-CALABUIG, A.; DEL VALLE, M. Analysis of amino acid mixtures by voltammetric electronic tongues and artificial neural networks. *Electroanalysis*, 28, 8, p.1894-1900, 2016.
- [158] MCCULLOCH, W. S.; PITTS, W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *The bulletin of mathematical biophysics*, 5, 4, p.115-133, 1943.
- [159] CETÓ, X.; CÉSPEDES, F.; DEL VALLE, M. Comparison of methods for the processing of voltammetric electronic tongues data. *Microchimica Acta*, 180, 5, p.319-330, 2013.
- [160] NOVAKOWSKI, W.; BERTOTTI, M.; PAIXAO, T. R. Use of copper and gold electrodes as sensitive elements for fabrication of an electronic tongue: Discrimination of wines and whiskies. *Microchemical Journal*, 99, 1, p.145-151, 2011.
- [161] BLANCO, C. A.; DE LA FUENTE, R.; CABALLERO, I.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L. Beer discrimination using a portable electronic tongue based on screen-printed electrodes. *Journal of Food Engineering*, 157, p.57-62, 2015.
- [162] LVOVA, L.; LEGIN, A.; VLASOV, Y.; CHA, G. S.; NAM, H. Multicomponent analysis of Korean green tea by means of disposable all-solid-state potentiometric electronic tongue microsystem. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 95, 1-3, p.391-399, 2003.
- [163] WINQUIST, F. Voltammetric electronic tongues—basic principles and applications. *Microchimica Acta*, 163, 1-2, p.3-10, 2008.
- [164] RUDNITSKAYA, A.; ROCHA, S. M.; LEGIN, A.; PEREIRA, V.; MARQUES, J. C. Evaluation of the feasibility of the electronic tongue as a rapid analytical tool for wine age prediction and quantification of the organic acids and phenolic compounds. The case-study of Madeira wine. *Analytica chimica acta*, 662, 1, p.82-89, 2010.
- [165] KRISTIANSEN, J.; CHRISTENSEN, J. M.; HENRIKSEN, T.; NIELSEN, N. H.; MENNÉ, T. Determination of nickel in fingernails and forearm skin (stratum corneum). *Analytica chimica acta*, 403, 1, p.265-272, 2000.
- [166] CEMPEL, M.; NIKEL, G. Nickel: a review of its sources and environmental toxicology. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15, 3, p.375-382, 2006.
- [167] CHAVES, E. S.; LEPRI, F. G.; SILVA, J. S. A.; DE QUADROS, D. P. C.; SAINT'PIERRE, T. D.; CURTIUS, A. J. Determination of Co, Cu, Fe, Mn, Ni and V in diesel and biodiesel samples by ETV-ICP-MS. *Journal of Environmental Monitoring*, 10, 10, p.1211-1216, 2008.
- [168] NASCIMENTO, D. S.; INSAUSTI, M.; BAND, B. S.; LEMOS, S. G. Simultaneous determination of Cu, Pb, Cd, Ni, Co and Zn in bioethanol fuel by adsorptive stripping voltammetry and multivariate linear regression. *Fuel*, 137, p.172-178, 2014.
- [169] TORMIN, T. F.; NARCISO, L. C. D.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Batch-injection stripping voltammetry of metals in fuel bioethanol. *Fuel*, 117, Part B, p.952-956, 2014.
- [170] BRASIL, Technical Regulation ANP nº 03. *DOU*: Brasilia, 2011.
- [171] FERANCOVÁ, A.; HATTUNIEMI, M. K.; SESAY, A. M.; RÄTY, J. P.; VIRTANEN, V. T. Rapid and direct electrochemical determination of Ni (II) in industrial discharge water. *Journal of Hazardous Materials*, 306, p.50-57, 2016.
- [172] WHO, World Health Organization. Nickel in drinking-water, in *Guidelines for drinking-water quality*, 4 ed. p.104-108. WHO: Geneva, 2011.
- [173] BRASIL, Provides for the conditions and effluent discharge standards. *DOU*: Brasilia, 2011.
- [174] SAINT'PIERRE, T. D.; TORMEN, L.; FRESCURA, V. L.; CURTIUS, A. J. The direct analysis of fuel ethanol by ICP-MS using a flow injection system coupled to an ultrasonic nebulizer for sample introduction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 11, p.1340-1344, 2006.

- [175] KORN, M. D. G. A.; SANTOS, D. S. S. D.; WELZ, B.; VALE, M. G. R.; TEIXEIRA, A. P.; LIMA, D. D. C.; FERREIRA, S. L. C. Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels – A review. *Talanta*, 73, 1, p.1-11, 2007.
- [176] MIRABI, A.; SHOKUHI RAD, A.; NOURANI, S. Application of modified magnetic nanoparticles as a sorbent for preconcentration and determination of nickel ions in food and environmental water samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, p.146-151, 2015.
- [177] TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L.; PADILHA, P. M.; STRADIOTTO, N. R. A solid paraffin-based carbon paste electrode modified with 2-aminothiazole organofunctionalized silica for differential pulse adsorptive stripping analysis of nickel in ethanol fuel. *Analytica chimica acta*, 584, 2, p.295-301, 2007.
- [178] SANTOS, A. L.; TAKEUCHI, R. M.; MUÑOZ, R. A.; ANGNES, L.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical determination of inorganic contaminants in automotive fuels. *Electroanalysis*, 24, 8, p.1681-1691, 2012.
- [179] PIHLAR, B.; VALENTA, P.; NÜRNBERG, H. W. Electrochemical reduction of Ni(II) on the hanging mercury drop electrode in the presence of dimethylglyoxime. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 214, 1, p.157-177, 1986.
- [180] ROLEIRA, F. M. F.; TAVARES-DA-SILVA, E. J.; VARELA, C. L.; COSTA, S. C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*, 183, p.235-258, 2015.
- [181] FAN, D.; JIA, L.; XIANG, H.; PENG, M.; LI, H.; SHI, S. Synthesis and characterization of hollow porous molecular imprinted polymers for the selective extraction and determination of caffeic acid in fruit samples. *Food Chemistry*, 224, p.32-36, 2017.
- [182] MARTÍ, R.; VALCÁRCEL, M.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M.; CEBOLLA-CORNEJO, J.; ROSELLÓ, S. Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column. *Food Chemistry*, 169, p.169-179, 2015.
- [183] NATALE, A.; NARDIELLO, D.; PALERMO, C.; MUSCARELLA, M.; QUINTO, M.; CENTONZE, D. Development of an analytical method for the determination of polyphenolic compounds in vegetable origin samples by liquid chromatography and pulsed amperometric detection at a glassy carbon electrode. *Journal of Chromatography a*, 1420, p.66-73, 2015.
- [184] SIVASANKAR, K.; DEVASENATHIPATHY, R.; WANG, S.-F.; RAJA, D. S.; LIN, C.-H. Synthesis of hierarchical mesoporous graphite oxide/Al₂O₃ from MIL-100 (Al) for the electrochemical determination of caffeic acid in red wine samples. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 84, p.188-195, 2018.
- [185] KHEZELI, T.; DANESHFAR, A.; SAHRAEI, R. A green ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of ferulic, caffeic and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oil. *Talanta*, 150, p.577-585, 2016.
- [186] AMES, B. N.; PROFET, M.; GOLD, L. S., Dietary carcinogens and mutagens from plants, in *Mutagens in Food*, ed. p.39-60. CRC Press: 2018.
- [187] GAN, Y.; TONG, X.; LI, L.; CAO, S.; YIN, X.; GAO, C.; HERATH, C.; LI, W.; JIN, Z.; CHEN, Y. Consumption of fruit and vegetable and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *International journal of cardiology*, 183, p.129-137, 2015.
- [188] BRAUTIGAN, D. L.; GIELATA, M.; HEO, J.; KUBICKA, E.; WILKINS, L. R. Selective toxicity of caffeic acid in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 505, 2, p.612-617, 2018.
- [189] LAWSON, M.; JOMOVA, K.; POPRAC, P.; KUČA, K.; MUSÍLEK, K.; VALKO, M., Free Radicals and Antioxidants in Human Disease, in *Nutritional Antioxidant Therapies: Treatments and Perspectives*, ed. p.283-305. Springer: 2017.

- [190] POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; KOLLAR, V.; RHODES, C. J.; VALKO, M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38, 7, p.592-607, 2017.
- [191] GAZDIK, Z.; KRŠKA, B.; ADAM, V.; SALOUN, J.; POKORNA, T.; REZNICEK, V.; HORNA, A.; KIZEK, R. Electrochemical determination of the antioxidant potential of some less common fruit species. *Sensors*, 8, 12, p.7564-7570, 2008.
- [192] ZHANG, L.; LI, Y.; LIANG, Y.; LIANG, K.; ZHANG, F.; XU, T.; WANG, M.; SONG, H.; LIU, X.; LU, B. Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry*, 276, p.538-546, 2019.
- [193] MEINHART, A. D.; CALDEIRAO, L.; DAMIN, F. M.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Analysis of chlorogenic acids isomers and caffeic acid in 89 herbal infusions (tea). *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, p.76-82, 2018.
- [194] HAGHI, G.; HATAMI, A.; ARSHI, R. Distribution of caffeic acid derivatives in *Gundelia tournefortii* L. *Food Chemistry*, 124, 3, p.1029-1035, 2011.
- [195] DAVID, I. G.; BIZGAN, A.-M. C.; POPA, D. E.; BULEANDRA, M.; MOLDOVAN, Z.; BADEA, I. A.; TEKINER, T. A.; BASAGA, H.; CIUCU, A. A. Rapid determination of total polyphenolic content in tea samples based on caffeic acid voltammetric behaviour on a disposable graphite electrode. *Food Chemistry*, 173, p.1059-1065, 2015.
- [196] SORDOŃ, W.; SALACHNA, A.; JAKUBOWSKA, M. Voltammetric determination of caffeic, syringic and vanillic acids taking into account uncertainties in both axes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 764, p.23-30, 2016.
- [197] NAGUL, E. A.; MCKELVIE, I. D.; WORSFOLD, P.; KOLEV, S. D. The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Analytica chimica acta*, 890, p.60-82, 2015.
- [198] OLIVEIRA-NETO, J. R.; REZENDE, S. G.; DE FÁTIMA REIS, C.; BENJAMIN, S. R.; ROCHA, M. L.; DE SOUZA GIL, E. Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. *Food Chemistry*, 190, p.506-512, 2016.
- [199] EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 14, p.8139-8144, 2010.
- [200] ZHANG, Y.; LIU, Y.; HE, J.; PANG, P.; GAO, Y.; HU, Q. Electrochemical behavior of caffeic acid assayed with gold nanoparticles/graphene nanosheets modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 25, 5, p.1230-1236, 2013.
- [201] TYSZCZUK, K.; SKALSKA-KAMIŃSKA, A.; WOŹNIAK, A. Voltammetric method using a lead film electrode for the determination of caffeic acid in a plant material. *Food Chemistry*, 125, 4, p.1498-1503, 2011.
- [202] SHENDURSE, A.; KHEDKAR, C. Glucose: Properties and Analysis. *Encyclopedia of Food and Health*, 3, p.239-247, 2016.
- [203] BODE, B.; BATTELINO, T. Continuous glucose monitoring. *International journal of clinical practice*, 64, p.11-15, 2010.
- [204] WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J. R. Implications for glucose measures in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes*, 63, 1, p.45-47, 2014.
- [205] WHITING, D. R.; GUARIGUATA, L.; WEIL, C.; SHAW, J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94, 3, p.311-321, 2011.
- [206] ARAKAWA, T.; KUROKI, Y.; NITTA, H.; CHOUHAN, P.; TOMA, K.; SAWADA, S.-I.; TAKEUCHI, S.; SEKITA, T.; AKIYOSHI, K.; MINAKUCHI, S.; MITSUBAYASHI, K. Mouthguard biosensor with telemetry system for monitoring of saliva glucose: A novel cavitas sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 84, p.106-111, 2016.
- [207] DHOOT, D. S.; AVERY, R. L. Vascular Endothelial Growth Factor Inhibitors for Diabetic Retinopathy. *Current Diabetes Reports*, 16, 12, p.122, 2016.

- [208] R. R. KALYANI, C. P. C., A. L. CHERRINGTON, D. R. COUSTAN, I. H. DE BOER, H. FELDMAN, J. FRADKIN, D. MAAHS, M. MARYNIUK, M. N. MUNSHI, J. J. NEUMILLER, G. E. UMPIERREZ. *American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes - 2018*, in *Diabetes care*. 2018. p. S13-S27.
- [209] BANDODKAR, A. J.; WANG, J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. *Trends in biotechnology*, 32, 7, p.363-371, 2014.
- [210] VISWANATH, B.; CHOI, C. S.; LEE, K.; KIM, S. Recent trends in the development of diagnostic tools for diabetes mellitus using patient saliva. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 89, p.60-67, 2017.
- [211] TURA, A.; MARAN, A.; PACINI, G. Non-invasive glucose monitoring: Assessment of technologies and devices according to quantitative criteria. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77, 1, p.16-40, 2007.
- [212] SONI, A.; JHA, S. K. A paper strip based non-invasive glucose biosensor for salivary analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 67, p.763-768, 2015.
- [213] YANG, G.; LIU, E.; KHUN, N. W.; JIANG, S. P. Direct electrochemical response of glucose at nickel-doped diamond like carbon thin film electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 627, 1-2, p.51-57, 2009.
- [214] HUO, Z.; ZHOU, Y.; LIU, Q.; HE, X.; LIANG, Y.; XU, M. Sensitive simultaneous determination of catechol and hydroquinone using a gold electrode modified with carbon nanofibers and gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 173, 1-2, p.119-125, 2011.
- [215] SÁNCHEZ-GÓMEZ, R.; ZALACAIN, A.; PARDO, F.; ALONSO, G. L.; SALINAS, M. R. An innovative use of vine-shoots residues and their "feedback" effect on wine quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, p.18-26, 2016.
- [216] ROMANO, A.; PERELLO, M. C.; LONVAUD-FUNEL, A.; SICARD, G.; DE REVEL, G. Sensory and analytical re-evaluation of "Brett character". *Food Chemistry*, 114, 1, p.15-19, 2009.
- [217] LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, 2006.
- [218] MILLET, V.; LONVAUD-FUNEL, A. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 2, p.136-141, 2000.
- [219] CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 4, p.463-468, 1995.
- [220] ARVIK, T.; HENICK-KLING, T. *Brettanomyces bruxellensis*: occurrence, growth, and effect on wine flavor. In *31st Annual New York Wine Industry Workshop*. Geneva, 2002.
- [221] GONZÁLEZ-CALABUIG, A.; DEL VALLE, M. Voltammetric electronic tongue to identify Brett character in wines. On-site quantification of its ethylphenol metabolites. *Talanta*, 179, p.70-74, 2018.
- [222] BURON, N.; COTON, M.; LEGENDRE, P.; LEDAUPHIN, J.; KIENTZ-BOUCHART, V.; GUICHARD, H.; BARILLIER, D.; COTON, E. Implications of *Lactobacillus collinoides* and *Brettanomyces/Dekkera anomala* in phenolic off-flavour defects of ciders. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 1, p.159-165, 2012.
- [223] CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. N.; PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 2, p.165-178, 1992.
- [224] MOREIRA, G. C.; DE SOUZA DIAS, F. Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. *Microchemical Journal*, 141, p.247-252, 2018.
- [225] LIAO, X.; GREENSPAN, P.; PEGG, R. B. Characterizing the phenolic constituents and antioxidant capacity of Georgia peaches. *Food Chemistry*, 271, p.345-353, 2019.
-

- [226] ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica chimica acta*, 427, 1, p.119-127, 2001.
- [227] PARADISO, V. M.; CLEMENTE, A.; SUMMO, C.; PASQUALONE, A.; CAPONIO, F. Towards green analysis of virgin olive oil phenolic compounds: Extraction by a natural deep eutectic solvent and direct spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, 212, p.43-47, 2016.
- [228] ROBBINS, K. S.; GONG, Y.; WELLS, M. L.; GREENSPAN, P.; PEGG, R. B. Investigation of the antioxidant capacity and phenolic constituents of US pecans. *Journal of Functional Foods*, 15, p.11-22, 2015.
- [229] GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L. D.; HIDALGO, F. J.; MIYASHITA, K.; CAMP, J. V.; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A. B.; ELMORE, S.; BIRCH, G. G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; ASTLEY, S. B.; PEGG, R.; ZHOU, P.; FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*, 264, p.471-475, 2018.
- [230] SHAHBAKSHI, M.; NOROOZIFAR, M. Poly (dopamine quinone-chromium (III) complex) microspheres as new modifier for simultaneous determination of phenolic compounds. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, p.439-448, 2018.
- [231] VILAS-BOAS, Â.; VALDERRAMA, P.; FONTES, N.; GERALDO, D.; BENTO, F. Evaluation of total polyphenol content of wines by means of voltammetric techniques: Cyclic voltammetry vs differential pulse voltammetry. *Food Chemistry*, 276, p.719-725, 2019.
- [232] DOUMER, M. E.; ARÍZAGA, G. G. C.; DA SILVA, D. A.; YAMAMOTO, C. I.; NOVOTNY, E. H.; SANTOS, J. M.; DOS SANTOS, L. O.; WISNIEWSKI, A.; DE ANDRADE, J. B.; MANGRICH, A. S. Slow pyrolysis of different Brazilian waste biomasses as sources of soil conditioners and energy, and for environmental protection. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 113, p.434-443, 2015.
- [233] KALINKE, C.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Biochar prepared from castor oil cake at different temperatures: A voltammetric study applied for Pb^{2+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions preconcentration. *Journal of Hazardous Materials*, 318, p.526-532, 2016.
- [234] IOANNIDOU, O.; ZABANIOTOU, A. Agricultural residues as precursors for activated carbon production - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11, 9, p.1966-2005, 2007.
- [235] HUFF, M. D.; LEE, J. W. Biochar-surface oxygenation with hydrogen peroxide. *Journal of Environmental Management*, 165, p.17-21, 2016.
- [236] BOEHM, H. Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons. *Carbon*, 32, 5, p.759-769, 1994.
- [237] BOEHM, H. Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. *Carbon*, 40, 2, p.145-149, 2002.
- [238] NILGHAZ, A.; BAGHERBAIGI, S.; LAM, C. L.; MOUSAVI, S. M.; CORCOLES, E. P.; WICAKSONO, D. H. Multiple semi-quantitative colorimetric assays in compact embeddable microfluidic cloth-based analytical device (μ CAD) for effective point-of-care diagnostic. *Microfluidics and nanofluidics*, 19, 2, p.317-333, 2015.
- [239] OLIVEIRA, P. R.; LAMY-MENDES, A. C.; REZENDE, E. I. P.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Electrochemical determination of copper ions in spirit drinks using carbon paste electrode modified with biochar. *Food Chem.*, 171, p.426-431, 2015.
- [240] ARRIBAS, A. S.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, M.; CHICHARRO, M. The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 34, p.78-96, 2012.
- [241] ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31, 2, p.57-139, 2001.

- [242] WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, 2002.
- [243] DING, Y.; WANG, Y.; SU, L.; BELLAGAMBA, M.; ZHANG, H.; LEI, Y. Electrospun Co_3O_4 nanofibers for sensitive and selective glucose detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2, p.542-548, 2010.
- [244] STEFANIAK, A. B.; HARVEY, C. J. Dissolution of materials in artificial skin surface film liquids. *Toxicology in Vitro*, 20, 8, p.1265-1283, 2006.
- [245] WANG, Y.; HASEBE, Y. Glucose oxidase-modified carbon-felt-reactor coupled with peroxidase-modified carbon-felt-detector for amperometric flow determination of glucose. *Materials Science and Engineering: C*, 32, 3, p.432-439, 2012.
- [246] CAETANO, F. R.; CARNEIRO, E. A.; AGUSTINI, D.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; BANKS, C. E.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Combination of electrochemical biosensor and textile threads: A microfluidic device for phenol determination in tap water. *Biosensors and Bioelectronics*, 99, Supplement C, p.382-388, 2018.
- [247] KALINKE, C.; OLIVEIRA, P. R.; OLIVEIRA, G. A.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Activated biochar: Preparation, characterization and electroanalytical application in an alternative strategy of nickel determination. *Analytica Chimica Acta*, 983, p.103-111, 2017.
- [248] STAVROPOULOS, G.; SAMARAS, P.; SAKELLAROPOULOS, G. Effect of activated carbons modification on porosity, surface structure and phenol adsorption. *Journal of Hazardous Materials*, 151, 2, p.414-421, 2008.
- [249] GASKIN, J.; STEINER, C.; HARRIS, K.; DAS, K.; BIBENS, B. Effect of low-temperature pyrolysis conditions on biochar for agricultural use. *Transactions of the ASABE*, 51, 6, p.2061-2069, 2008.
- [250] YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86, 12, p.1781-1788, 2007.
- [251] VAN DE VELDEN, M.; BAEYENS, J.; BREMS, A.; JANSSENS, B.; DEWIL, R. Fundamentals, kinetics and endothermicity of the biomass pyrolysis reaction. *Renewable Energy*, 35, 1, p.232-242, 2010.
- [252] EL-HENDAWY, A.-N. A. Influence of HNO_3 oxidation on the structure and adsorptive properties of corncob-based activated carbon. *Carbon*, 41, 4, p.713-722, 2003.
- [253] LÓPEZ-GARZÓN, F. J.; DOMINGO-GARCÍA, M.; PÉREZ-MENDOZA, M.; ALVAREZ, P. M.; GÓMEZ-SERRANO, V. Textural and chemical surface modifications produced by some oxidation treatments of a glassy carbon. *Langmuir*, 19, 7, p.2838-2844, 2003.
- [254] INYANG, M.; GAO, B.; ZIMMERMAN, A.; ZHANG, M.; CHEN, H. Synthesis, characterization, and dye sorption ability of carbon nanotube – biochar nanocomposites. *Chemical Engineering Journal*, 236, p.39-46, 2014.
- [255] NG, C.; LOSSO, J. N.; MARSHALL, W. E.; RAO, R. M. Physical and chemical properties of selected agricultural byproduct-based activated carbons and their ability to adsorb geosmin. *Bioresource Technology*, 84, 2, p.177-185, 2002.
- [256] SANTOS, L. B.; STRIEBECK, M. V.; CRESPI, M. S.; RIBEIRO, C. A.; DE JULIO, M. Characterization of biochar of pine pellet. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 122, 1, p.21-32, 2015.
- [257] ROBERTSON, J. Diamond-like amorphous carbon. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 37, 4, p.129-281, 2002.
- [258] RHIM, Y.-R.; ZHANG, D.; FAIRBROTHER, D. H.; WEPASNICK, K. A.; LIVI, K. J.; BODNAR, R. J.; NAGLE, D. C. Changes in electrical and microstructural properties of microcrystalline cellulose as function of carbonization temperature. *Carbon*, 48, 4, p.1012-1024, 2010.
- [259] JIANG, J.; ZHANG, L.; WANG, X.; HOLM, N.; RAJAGOPALAN, K.; CHEN, F.; MA, S. Highly ordered macroporous woody biochar with ultra-high carbon content as supercapacitor electrodes. *Electrochimica Acta*, 113, p.481-489, 2013.

- [260] KEILUWEIT, M.; NICO, P. S.; JOHNSON, M. G.; KLEBER, M. Dynamic molecular structure of plant biomass-derived black carbon (biochar). *Environmental Science & Technology*, 44, 4, p.1247-1253, 2010.
- [261] MAHALAKSHMY, R.; INDRANEEL, P.; VISWANATHAN, B. Surface functionalities of nitric acid treated carbon - A density functional theory based vibrational analysis. *Indian Journal of Chemistry*, 48A, p.352-356, 2009.
- [262] GHANI, W. A. W. A. K.; MOHD, A.; DA SILVA, G.; BACHMANN, R. T.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; RASHID, U.; ALA'A, H. Biochar production from waste rubber-wood-sawdust and its potential use in C sequestration: Chemical and physical characterization. *Industrial Crops and Products*, 44, p.18-24, 2013.
- [263] TABAK, A.; AFSIN, B.; CAGLAR, B.; KOKSAL, E. Characterization and pillaring of a Turkish bentonite (Resadiye). *Journal of Colloid and Interface Science*, 313, 1, p.5-11, 2007.
- [264] STAINSACK, J.; MANGRICH, A. S.; MAIA, C. M.; MACHADO, V. G.; DOS SANTOS, J. C.; NAKAGAKI, S. Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin. *Inorganica Chimica Acta*, 356, p.243-248, 2003.
- [265] CHINGOMBE, P.; SAHA, B.; WAKEMAN, R. Surface modification and characterisation of a coal-based activated carbon. *Carbon*, 43, 15, p.3132-3143, 2005.
- [266] CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry: Part A: Structure and Mechanisms*. 5 ed. Springer Science & Business Media: 2007.
- [267] SOUZA, J. P. D. Produção e modificação de carvões ativados a partir de matérias-primas de baixo custo: osso bovino e cascas de sementes de moringa. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Ouro Preto: Ouro Preto, 2010.
- [268] JULIEN, F.; BAUDU, M.; MAZET, M. Relationship between chemical and physical surface properties of activated carbon. *Water Research*, 32, 11, p.3414-3424, 1998.
- [269] ANGELO, L. C.; DOUMER, M. E.; MANGRICH, A. S. Influência da concentração do HNO₃ sobre as propriedades estruturais e adsorptivas de finos de carvão vegetal funcionalizados, in *X Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Brasília, 2013.
- [270] QIAN, L.; CHEN, B. Interactions of aluminum with biochars and oxidized biochars: implications for the biochar aging process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2, p.373-380, 2014.
- [271] HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12, 2, p.265-273, 2013.
- [272] LI, H.; YE, X.; GENG, Z.; ZHOU, H.; GUO, X.; ZHANG, Y.; ZHAO, H.; WANG, G. The influence of biochar type on long-term stabilization for Cd and Cu in contaminated paddy soils. *Journal of Hazardous Materials*, 304, p.40-48, 2016.
- [273] HUANG, C.-C.; SU, Y.-J. Removal of copper ions from wastewater by adsorption/electrosorption on modified activated carbon cloths. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 1, p.477-483, 2010.
- [274] RADOVIC-MORENO, A. F.; LU, T. K.; PUSCASU, V. A.; YOON, C. J.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. *ACS nano*, 6, 5, p.4279-4287, 2012.
- [275] BATISTA, E. M.; SHULTZ, J.; MATOS, T. T.; FORNARI, M. R.; FERREIRA, T. M.; SZPOGANICZ, B.; DE FREITAS, R. A.; MANGRICH, A. S. Effect of surface and porosity of biochar on water holding capacity aiming indirectly at preservation of the Amazon biome. *Scientific Reports*, 8, 1, p.10677, 2018.
- [276] DE OLIVEIRA, U. M. F.; LICHTIG, J.; MASINI, J. C. Evaluation of a nafion coated glassy carbon electrode for determination of paraquat by differential pulse voltammetry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15, 5, p.735-741, 2004.
- [277] SANGHAVI, B. J.; HIRSCH, G.; KARNA, S. P.; SRIVASTAVA, A. K. Potentiometric stripping analysis of methyl and ethyl parathion employing carbon nanoparticles and halloysite nanoclay modified carbon paste electrode. *Analytica chimica acta*, 735, p.37-45, 2012.

- [278] BRAIMOH, A.; VLEK, P. The impact of land-cover change on soil properties in northern Ghana. *Land Degradation & Development*, 15, 1, p.65-74, 2004.
- [279] GÜZEL, F.; YAKUT, H.; TOPAL, G. Determination of kinetic and equilibrium parameters of the batch adsorption of Mn(II), Co(II), Ni(II) and Cu(II) from aqueous solution by black carrot (*Daucus carota* L.) residues. *Journal of Hazardous Materials*, 153, 3, p.1275-1287, 2008.
- [280] ZAMZOW, M.; EICHBAUM, B.; SANDGREN, K.; SHANKS, D. Removal of heavy metals and other cations from wastewater using zeolites. *Separation science and technology*, 25, 13-15, p.1555-1569, 1990.
- [281] FARAHI, A.; ACHAK, M.; EL GAINI, L.; EL MHAMMEDI, M. A.; BAKASSE, M. Silver particles-modified carbon paste electrodes for differential pulse voltammetric determination of paraquat in ambient water samples. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 19, p.37-43, 2016.
- [282] WHO, World Health Organization. Methyl Parathion in Drinking-water, in *Guidelines for Drinking-water Quality*, 1 ed. WHO: Geneva, 2004.
- [283] YAO, Y.; ZHANG, L.; XU, J.; WANG, X.; DUAN, X.; WEN, Y. Rapid and sensitive stripping voltammetric analysis of methyl parathion in vegetable samples at carboxylic acid-functionalized SWCNTs- β -cyclodextrin modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 713, p.1-8, 2014.
- [284] LI, H.; WANG, Z.; WU, B.; LIU, X.; XUE, Z.; LU, X. Rapid and sensitive detection of methyl-parathion pesticide with an electropolymerized, molecularly imprinted polymer capacitive sensor. *Electrochim. Acta*, 62, p.319-326, 2012.
- [285] XUE, X.; WEI, Q.; WU, D.; LI, H.; ZHANG, Y.; FENG, R.; DU, B. Determination of methyl parathion by a molecularly imprinted sensor based on nitrogen doped graphene sheets. *Electrochimica Acta*, 116, p.366-371, 2014.
- [286] VILLACAÑAS, F.; PEREIRA, M. F. R.; ÓRFÃO, J. J.; FIGUEIREDO, J. L. Adsorption of simple aromatic compounds on activated carbons. *Journal of Colloid and Interface Science*, 293, 1, p.128-136, 2006.
- [287] SILVESTRE-ALBERO, A.; SILVESTRE-ALBERO, J.; SEPÚLVEDA-ESCRIBANO, A.; RODRÍGUEZ-REINOSO, F. Ethanol removal using activated carbon: Effect of porous structure and surface chemistry. *Microporous and Mesoporous Materials*, 120, 1, p.62-68, 2009.
- [288] GAYER, K. H.; GARRETT, A. The equilibria of nickel hydroxide, Ni(OH)₂, in solutions of hydrochloric acid and sodium hydroxide at 25° C. *Journal of the American Chemical Society*, 71, 9, p.2973-2975, 1949.
- [289] MILLER, J. N.; MILLER, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6 ed. Pearson: Harlow, 2010.
- [290] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE nº 899, 2003.
- [291] TARTAROTTI, O. F.; DE OLIVEIRA, F. M.; BALBO, R. V.; STRADIOTTO, R. N. Determination of Nickel in Fuel Ethanol Using a Carbon Paste Modified Electrode Containing Dimethylglyoxime. *Microchimica Acta*, 155, 3, p.397-401, 2006.
- [292] KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; RAPTIS, I.; SPELIOTIS, T. Disposable mercury-free cell-on-a-chip devices with integrated microfabricated electrodes for the determination of trace nickel(II) by adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 622, 1-2, p.111-118, 2008.
- [293] SAIDIN, M. I.; ISA, I. M.; AHMAD, M.; HASHIM, N.; AB GHANI, S. Analysis of trace nickel by square wave stripping voltammetry using chloropalladium (II) complex-modified MWCNTs paste electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 240, p.848-856, 2017.
- [294] BOBROWSKI, A.; KRÓLICKA, A.; MACZUGA, M.; ZARĘBSKI, J. A novel screen-printed electrode modified with lead film for adsorptive stripping voltammetric determination of cobalt and nickel. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 191, p.291-297, 2014.

- [295] EL MHAMMEDI, M. A.; BAKASSE, M.; CHTAINI, A. Square-wave voltammetric determination of paraquat at carbon paste electrode modified with hydroxyapatite. *Electroanalysis*, 19, 16, p.1727-1733, 2007.
- [296] THANGAVELU, K.; RAJA, N.; CHEN, S.-M.; LIAO, W.-C. Nanomolar electrochemical detection of caffeic acid in fortified wine samples based on gold/palladium nanoparticles decorated graphene flakes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 501, p.77-85, 2017.
- [297] LIU, W.-J.; ZENG, F.-X.; JIANG, H.; ZHANG, X.-S. Preparation of high adsorption capacity bio-chars from waste biomass. *Bioresource Technology*, 102, 17, p.8247-8252, 2011.
- [298] ABDUL, G.; ZHU, X.; CHEN, B. Structural characteristics of biochar-graphene nanosheet composites and their adsorption performance for phthalic acid esters. *Chemical Engineering Journal*, 319, p.9-20, 2017.
- [299] KALDERIS, D.; KAYAN, B.; AKAY, S.; KULAKSIZ, E.; GÖZMEN, B. Adsorption of 2, 4-dichlorophenol on paper sludge/wheat husk biochar: Process optimization and comparison with biochars prepared from wood chips, sewage sludge and hog fuel/demolition waste. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 3, p.2222-2231, 2017.
- [300] BORGES, W. M. S.; ARANTES, A. C. C.; BIANCHI, M. L.; DE RESENDE, E. C.; BOARI, P. V.; GUERREIRO, M. C.; PERÍGOLO, D. M. Carvão Ativado de Resíduo de Madeira de Candeia: Produção, Caracterização e Avaliação do Potencial Adsorptivo. *Revista Virtual de Química*, 7, 6, p.1952-1967, 2015.
- [301] OLIVEIRA, P. R.; KALINKE, C.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Copper hexacyanoferrate nanoparticles supported on biochar for amperometric determination of isoniazid. *Electrochimica Acta*, 285, p.373-380, 2018.
- [302] KIM, K.; HAN, J. W. Effect of caffeic acid adsorption in controlling the morphology of gold nanoparticles: role of surface coverage and functional groups. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18, 40, p.27775-27783, 2016.
- [303] PHOTINON, K.; CHALERMCHART, Y.; KHANONGNUCH, C.; WANG, S.-H.; LIU, C.-C. A thick-film sensor as a novel device for determination of polyphenols and their antioxidant capacity in white wine. *Sensors*, 10, 3, p.1670-1678, 2010.
- [304] GAMELLA, M.; CAMPUZANO, S.; REVIEJO, A.; PINGARRÓN, J. Electrochemical estimation of the polyphenol index in wines using a laccase biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 21, p.7960-7967, 2006.
- [305] GRANERO, A. M.; FERNÁNDEZ, H.; AGOSTINI, E.; ZÓN, M. A. An amperometric biosensor based on peroxidases from Brassica napus for the determination of the total polyphenolic content in wine and tea samples. *Talanta*, 83, 1, p.249-255, 2010.
- [306] MORENO, M.; ARRIBAS, A. S.; BERMEJO, E.; ZAPARDIEL, A.; CHICHARRO, M. Analysis of polyphenols in white wine by CZE with amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes. *Electrophoresis*, 32, 8, p.877-883, 2011.
- [307] SANTOS, D. P.; BERGAMINI, M. F.; FOGG, A. G.; ZANONI, M. V. B. Application of a Glassy Carbon Electrode Modified with Poly(Glutamic Acid) in Caffeic Acid Determination. *Microchimica Acta*, 151, 1, p.127-134, 2005.
- [308] KARIKALAN, N.; KARTHIK, R.; CHEN, S.-M.; CHEN, H.-A. A voltammetric determination of caffeic acid in red wines based on the nitrogen doped carbon modified glassy carbon electrode. *Scientific Reports*, 7, p.45924, 2017.
- [309] THANGAVELU, K.; PALANISAMY, S.; CHEN, S.-M.; VELUSAMY, V.; CHEN, T.-W.; RAMARAJ, S. K. Electrochemical determination of caffeic acid in wine samples using reduced graphene oxide/polydopamine composite. *Journal of The Electrochemical Society*, 163, 14, p.B726-B731, 2016.
- [310] WANG, J.; ZHANG, K.; XU, H.; YAN, B.; GAO, F.; SHI, Y.; DU, Y. Engineered photoelectrochemical platform for the ultrasensitive detection of caffeic acid based on flower-like MoS₂ and PANI nanotubes nanohybrid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 276, p.322-330, 2018.

- [311] SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F.; CROUCH, S. *Fundamentos de Química Analítica*. Pioneira: São Paulo, 2006.
- [312] XING, S.; JIANG, J.; PAN, T. Interfacial microfluidic transport on micropatterned superhydrophobic textile. *Lab on a Chip*, 13, 10, p.1937-1947, 2013.
- [313] RUZICKA, J.; RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. *Flow injection analysis*. v.62. John Wiley & Sons: 1988.
- [314] WISITSORAAT, A.; SRITONGKHAM, P.; KARUWAN, C.; PHOKHARATKUL, D.; MATUROS, T.; TUANTRANONT, A. Fast cholesterol detection using flow injection microfluidic device with functionalized carbon nanotubes based electrochemical sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4, p.1514-1520, 2010.
- [315] PENG, B.; LU, J.; BALIJEPALLI, A. S.; MAJOR, T. C.; COHAN, B. E.; MEYERHOFF, M. E. Evaluation of enzyme-based tear glucose electrochemical sensors over a wide range of blood glucose concentrations. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, p.204-209, 2013.
- [316] YI, Q.; HUANG, W.; YU, W.; LI, L.; LIU, X. Hydrothermal synthesis of titanium-supported nickel nanoflakes for electrochemical oxidation of glucose. *Electroanalysis*, 20, 18, p.2016-2022, 2008.
- [317] MU, Y.; JIA, D.; HE, Y.; MIAO, Y.; WU, H.-L. Nano nickel oxide modified non-enzymatic glucose sensors with enhanced sensitivity through an electrochemical process strategy at high potential. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 6, p.2948-2952, 2011.
- [318] CAO, F.; GUO, S.; MA, H.; SHAN, D.; YANG, S.; GONG, J. Nickel oxide microfibers immobilized onto electrode by electrospinning and calcination for nonenzymatic glucose sensor and effect of calcination temperature on the performance. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 5, p.2756-2760, 2011.
- [319] KANNAN, P. K.; ROUT, C. S. High Performance Non-enzymatic Glucose Sensor Based on One-Step Electrodeposited Nickel Sulfide. *Chemistry-A European Journal*, 21, 26, p.9355-9359, 2015.
- [320] SHAMSIPUR, M.; NAJAFI, M.; HOSSEINI, M.-R. M. Highly improved electrooxidation of glucose at a nickel (II) oxide/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 77, 2, p.120-124, 2010.
- [321] VAN AKEN, K.; STREKOWSKI, L.; PATINY, L. EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters. *Beilstein journal of organic chemistry*, 2, 3, p.1-7, 2006.
- [322] LUNDGREN, C.; MURRAY, R. W. Observations on the composition of Prussian blue films and their electrochemistry. *Inorganic Chemistry*, 27, 5, p.933-939, 1988.
- [323] PRADELA-FILHO, L. A.; OLIVEIRA, B. C.; TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L. A Prussian blue-carbon paste electrode for selective cathodic amperometric determination of nitrite using a flow-injection analysis system with carrier recycling. *Electrochimica Acta*, 180, p.939-946, 2015.
- [324] KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E.; GORTON, L. On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, 1, 2, p.78-82, 1999.
- [325] FERREIRA, M.; FIORITO, P. A.; OLIVEIRA, O. N.; CÓRDOBA DE TORRESI, S. I. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 12, p.1611-1615, 2004.
- [326] LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. A biosensor based on immobilization of lactate oxidase in a PB-CTAB film for FIA determination of lactate in beer samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19, 4, p.637-642, 2008.
- [327] BLAIK, R. A.; LAN, E.; HUANG, Y.; DUNN, B. Gold-Coated M13 Bacteriophage as a Template for Glucose Oxidase Biofuel Cells with Direct Electron Transfer. *ACS nano*, 10, 1, p.324-332, 2016.
- [328] YUN, D.; SONG, M.; HONG, S.; KANG, M.; MIN, N. Highly sensitive and renewable amperometric urea sensor based on self-assembled monolayer using porous silicon substrate. *JOURNAL-KOREAN PHYSICAL SOCIETY*, 47, p.S445, 2005.

- [329] AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Tear glucose detection combining microfluidic thread based device, amperometric biosensor and microflow injection analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 98, p.161-167, 2017.
- [330] LI, J.; SUN, C.; YU, N.; WANG, C.; ZHANG, T.; BU, H. Hexaconazole–Cu complex improves the salt tolerance of *Triticum aestivum* seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 127, p.90-94, 2016.
- [331] CALEGARI, F.; DE SOUZA, L. P.; BARSAN, M. M.; BRETT, C. M.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Construction and evaluation of carbon black and poly (ethylene co-vinyl) acetate (EVA) composite electrodes for development of electrochemical (bio) sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 253, p.10-18, 2017.
- [332] LEE, S. H.; CHUNG, J.-H.; PARK, H.-K.; LEE, G.-J. A simple and facile glucose biosensor based on Prussian blue modified graphite string. *Journal of Sensors*, 2016, 2016.
- [333] DENG, C.; LI, M.; XIE, Q.; LIU, M.; TAN, Y.; XU, X.; YAO, S. New glucose biosensor based on a poly(o-phenylenediamine)/glucose oxidase-glutaraldehyde/Prussian blue/Au electrode with QCM monitoring of various electrode-surface modifications. *Analytica chimica acta*, 557, 1, p.85-94, 2006.
- [334] FU, G.; YUE, X.; DAI, Z. Glucose biosensor based on covalent immobilization of enzyme in sol–gel composite film combined with Prussian blue/carbon nanotubes hybrid. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 9, p.3973-3976, 2011.
- [335] HAGHIGHI, B.; HAMIDI, H.; GORTON, L. Electrochemical behavior and application of Prussian blue nanoparticle modified graphite electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 147, 1, p.270-276, 2010.
- [336] WANG, X.; GU, H.; YIN, F.; TU, Y. A glucose biosensor based on Prussian blue/chitosan hybrid film. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 5, p.1527-1530, 2009.
- [337] WANG, H.; WANG, X.; ZHANG, X.; QIN, X.; ZHAO, Z.; MIAO, Z.; HUANG, N.; CHEN, Q. A novel glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles-modified Pb nanowires. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 1, p.142-146, 2009.
- [338] CHANDRA SEKAR, N.; MOUSAVI SHAEGH, S. A.; NG, S. H.; GE, L.; TAN, S. N. A paper-based amperometric glucose biosensor developed with Prussian Blue-modified screen-printed electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204, p.414-420, 2014.
- [339] THAKUR, B.; GUO, X.; CHANG, J.; KRON, M.; CHEN, J. Porous carbon and Prussian blue composite: A highly sensitive electrochemical platform for glucose biosensing. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 14, p.47-53, 2017.
- [340] WISSLER, M. Graphite and carbon powders for electrochemical applications. *Journal of power sources*, 156, 2, p.142-150, 2006.
- [341] SENGUPTA, R.; BHATTACHARYA, M.; BANDYOPADHYAY, S.; BHOWMICK, A. K. A review on the mechanical and electrical properties of graphite and modified graphite reinforced polymer composites. *Progress in Polymer Science*, 36, 5, p.638-670, 2011.
- [342] ZHAO, Q.; GAN, Z.; ZHUANG, Q. Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. *Electroanalysis*, 14, 23, p.1609-1613, 2002.
- [343] BRETT, C.; OLIVEIRA BRETT, A. M. *Electrochemistry: principles, methods, and applications* 1993.
- [344] DINIZ, F. B.; UETA, R. R. Platinum oxidation and its effect on concanavalin A adsorption. *Electrochimica Acta*, 49, 25, p.4281-4286, 2004.
- [345] JERKOVIĆ, A.; ABOU-AHMED, S.; ERTL, P.; STOEßL, B.; LENGAUER, V.; SAMPHAO, A.; KALCHER, K.; LEITINGER, G.; WERNITZNIG, S.; ORTNER, A. Development of a cobalt(II) phthalocyanine- MWCNT modified carbon paste electrode for the detection of polyunsaturated fatty acids. *Analytica chimica acta*, 1038, p.52-58, 2018.
- [346] DONG, X.; HE, L.; LIU, Y.; PIAO, Y. Preparation of highly conductive biochar nanoparticles for rapid and sensitive detection of 17 β -estradiol in water. *Electrochimica Acta*, 292, p.55-62, 2018.

[347] DONG, X.; HE, L.; HU, H.; LIU, N.; GAO, S.; PIAO, Y. Removal of 17 β -estradiol by using highly adsorptive magnetic biochar nanoparticles from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 352, p.371-379, 2018.

[348] GONZÁLEZ-CALABUIG, A.; CETÓ, X.; DEL VALLE, M. A Voltammetric Electronic Tongue for the Resolution of Ternary Nitrophenol Mixtures. *Sensors*, 18, 1, p.216-226, 2018.

[349] SUNIL KUMAR NAIK, T. S.; KUMARA SWAMY, B. E. Modification of carbon paste electrode by electrochemical polymerization of neutral red and its catalytic capability towards the simultaneous determination of catechol and hydroquinone: A voltammetric study. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 804, p.78-86, 2017.

[350] CHEN, Z.; CHEN, B.; CHIOU, C. T. Fast and slow rates of naphthalene sorption to biochars produced at different temperatures. *Environmental science & technology*, 46, 20, p.11104-11111, 2012.

[351] SHI, K.; XIE, Y.; QIU, Y. Natural oxidation of a temperature series of biochars: Opposite effect on the sorption of aromatic cationic herbicides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, p.102-108, 2015.

ANEXO 1 – DISCIPLINAS CURSADAS

A TABELA 30 apresenta a relação das disciplinas cursadas durante o período de doutorado, com os respectivos créditos e conceitos obtidos. Sendo totalizados 18 créditos.

TABELA 30 – DISCIPLINAS CURSADAS DURANTE O DOUTORADO, COM OS RESPECTIVOS CRÉDITOS E CONCEITOS OBTIDOS

| Disciplina | Professor | Créditos / Carga Horária | Conceito |
|---|-----------------------------|-----------------------------|----------|
| Tópicos Especiais em Química II Eletroquímica e Interfaces | Marcio E. Vidotti Miyata | 4 / 60 h | A |
| Métodos Eletroquímicos* | Haroldo A. Ponte | 4 / 60 h | A |
| Tópicos Especiais em Química II Metodologia Científica e Redação Acadêmica/Científica | Elisa S. Orth | 4 / 60 h | A |
| Seminários C | Marcio P. de Araújo | 1 / 15 h | A |
| Práticas de Docência em Química | Márcio F. Bergamini | 1 / 15 h | A |
| Tópicos Especiais em Química II Validação de Métodos Analíticos | Andrea P. de Oliveira | 4 / 60 h | A |
| Calibração Multivariada em Química Analítica** | Noemi Nagata | - | - |

*Disciplina realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais (PIPE) da UFPR.

**Disciplina cursada como ouvinte.

ANEXO 2 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos Científicos

1. KALINKE, C. DE OLIVEIRA, P.R.; SAN-EMETERIO, M.B.; GONZÁLEZ-CALABUIG, A.; DEL VALLE, M.; MANGRICH, A.S.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H.; BERGAMINI, M.F. Voltammetric electronic tongue based on carbon paste electrodes modified with biochar for phenolic compounds detection. *Electroanalysis*, 2019. (Aceito para publicação)
2. KALINKE, C.; WOSGRAU, V.; DE OLIVEIRA, P.R.; OLIVEIRA, G.A.; MARTINS, G.; MANGRICH, A.S.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H.; BERGAMINI, M.F. Green method for glucose determination using microfluidic device with a non-enzymatic sensor based on nickel oxyhydroxide supported at activated biochar. *Talanta*, 200, p.518-525, 2019.
3. DE OLIVEIRA, P. R.; KALINKE, C.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Copper hexacyanoferrate nanoparticles supported on biochar for amperometric determination of isoniazid. *Electrochimica Acta*, 285, p.373-380, 2018.
4. KALINKE, C.; DE OLIVEIRA, P. R.; DE OLIVEIRA, G. A.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Activated biochar: Preparation, characterization and electroanalytical application in an alternative strategy of nickel determination. *Analytical Chimica Acta*, 983, p.103-111, 2017.
5. DE OLIVEIRA, P. R.; KALINKE, C.; GOGOLA, J. L.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. The use of activated biochar for development of a sensitive electrochemical sensor for determination of methyl parathion. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 799, p.602-608, 2017.
6. KALINKE, C.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Biochar prepared from castor oil cake at different temperatures: A voltammetric study applied for Pb²⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions preconcentration. *Journal of Hazardous Materials*, 318, p.526-532, 2016.
7. KALINKE, C.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Carbon Paste Electrode Modified with Biochar for Sensitive Electrochemical Determination of Paraquat. *Electroanalysis*, 28, p.764-769, 2015.

Apresentação de Trabalhos

1. MOSCARDI, A.P.Z.; KALINKE, C.; BERGAMINI, M.F.; MARCOLINO-JR, L.H.. Voltammetric evaluation of an activated biochar modified carbon paste electrode for the determination of caffeic acid. *42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (42ª RASBQ)*. Joinville, 2019.
2. KALINKE, C.; DEL VALLE, M.Z.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Electrodes based on biochar: Application in the determination of phenolic compounds. *3º Scientific Meeting of BCN-b PhD Students in Nanoscience*. Barcelona, 2018.
3. KALINKE, C.; OLIVEIRA, P. R.; OLIVEIRA, G. A.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Uma nova estratégia para a determinação de níquel utilizando um eletrodo modificado com biochar ativado. *XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE)*. Natal, 2017.
4. KALINKE, C.; OLIVEIRA, G. A.; OLIVEIRA, P. R.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Biochar quimicamente ativado: Um novo conceito na modificação de eletrodos. Apresentação na modalidade de Comunicação Oral. *XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE)*. Natal, 2017.
5. OLIVEIRA, G. A.; KALINKE, C.; OLIVEIRA, P. R.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Electrodes modified with biochar employees in a new strategy for the determination of Ni(II) ions in fuel samples. *II International Seminar of Industrial Innovation in Electrochemistry*. Curitiba, 2016.
6. KALINKE, C.; OLIVEIRA, G. A.; OLIVEIRA, P. R.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Avaliação de eletrodos de pasta de carbono modificados com biochar ativado para a determinação voltamétrica de íons Ni(II). *XXIII Encontro de Química da Região Sul*. Santa Maria, 2016.
7. KALINKE, C.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Avaliação eletroquímica de eletrodos de pasta de carbono modificados com biochar para a pré-concentração e determinação de paraquat. Apresentação na modalidade de Comunicação Oral. *XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica(XX SIBEE)*. Uberlândia, 2015.