

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCIA GABRIELA PIANARO VALENGA

BIOCHAR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES E
BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE,
CREATININA E ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS SARS-CoV-2

CURITIBA

2023

MARCIA GABRIELA PIANARO VALENGA

BIOCHAR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES E
BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE,
CREATININA E ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS SARS-CoV-2

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

Orientador:

Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini

Coorientadores:

Dra. Ava Gevaerd

Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Jr.

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Valenga, Marcia Gabriela Pianaro

Biochar de bagaço de cana-de-açúcar : produção, caracterização e aplicação na construção de sensores e biossensores eletroquímicos para determinação de cobre, creatinina e anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2 / Marcia Gabriela Pianaro Valenga. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Márcio Fernando Bergamini

Coorientadores: Ava Gevaerd; Luiz Humberto Marcolino Junior

1. Biocarvão. 2. Bagaço de cana. 3. Cobre. 4. Creatinina. 5. SARS-CoV-2. 6. Biossensores. 7. Detectores eletroquímicos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Bergamini, Márcio Fernando. IV. Gevaerd, Ava. V. Marcolino Junior, Luiz Humberto. VI. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MARCIA GABRIELA PIANARO VALENGA** intitulada: **BIOCHAR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES E BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE, CREATININA E ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS SARS-COV-2**, sob orientação do Prof. Dr. MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 17 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

20/03/2023 08:59:04.0

MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 11:33:32.0

ANDREA PINTO DE OLIVEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 15:43:12.0

ANDRÉ LUIZ DOS SANTOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA)

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 10:54:12.0

REGINA MASSAKO TAKEUCHI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA)

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 10:59:11.0

GLAUCIA PANTANO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Ao meu pai, Francisco, e à minha irmã, Marcia Daniela, pelo apoio incondicional.
Em especial, à minha mãe, Marcia Aparecida, que tem me mostrado diariamente como a
vida vale a pena ser vivida e como sonhos e objetivos podem ser alcançados.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini, pelo acolhimento no grupo de pesquisa e por toda a atenção e compreensão demonstradas desde a escrita do projeto de tese, até a redação deste trabalho final.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino-Júnior, pela atenção e disponibilidade.

À minha coorientadora, Dra. Ava Gevaerd, que me acolheu no primeiro dia de laboratório e sempre esteve disposta a discutir e sanar dúvidas.

Aos professores Dr. Dênio Souto e Dr. Marcio Vidotti, pelas sugestões e considerações na defesa do projeto de doutorado para ingresso no programa. Também ao Prof. Dr. Marcio Vidotti, meus agradecimentos pelas contribuições na banca de qualificação de doutorado.

Ao Prof. Dr. André L. dos Santos, da UFU, pelas contribuições nas bancas de qualificação e de defesa de tese.

À Profa. Dra. Glaucia Pantano, da UFPR, pelas contribuições nas bancas de qualificação e de defesa de tese.

À Profa. Dra. Regina M. Takeuchi, da UFU, pelas contribuições na banca de defesa de tese.

À Profa. Dra. Andrea P. de Oliveira, da UFPR, pelas contribuições na banca de defesa de tese.

Ao Prof. Dr. Antônio S. Mangrich e ao grupo LABPPAM/UFPR, em especial à Dra. Tassya Matos e à Dra. Mayara Fornari, por toda a ajuda na produção do biochar.

À Central Analítica do Departamento de Química da UFPR, ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e ao Grupo de Pesquisa em Sensores Eletroquímicos e (nano)Materiais da UFS, pela ajuda na caracterização dos materiais.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, pelo fornecimento de materiais necessários à realização desse trabalho.

À UFPR, ao Programa de Pós-Graduação em Química e às Agências de Fomento – CNPq, CAPES e Fundação Araucária – por fornecerem a infraestrutura física e o auxílio financeiro necessários à execução desse projeto.

Ao senhor proprietário da barraca de caldo de cana na Av. Cel. Francisco Heráclito dos Santos, próximo a saída do Centro Politécnico. Se não fosse o senhor ter me cedido a matéria-prima para a realização deste trabalho, ele não teria acontecido. Muito obrigada!

Aos amigos do LabSense e agregados, que sempre estiveram dispostos a discutir experimentos, resolver problemas e tirar dúvidas. Por todas as conversas e desabafos, cafés e cigarros, meu muito obrigada!

Aos amigos e colegas que conheci nos projetos “Meninas e Mulheres nas Ciências” e “Ciência e Criança” da UFPR, em especial à minha supervisora Profa. Dra. Tatiana Simões, por me apresentarem o mundo encantador da extensão universitária e propiciarem momentos de fuga da rotina acadêmica.

À minha amiga Tatiana Lima Valério, por todo acolhimento em Curitiba e na UFPR.

À minha amiga Ketlyn Borth, que esteve presente em cada momento dessa jornada e não mediu esforços pra me ajudar, desde as medidas de FTIR e os surtos antes das apresentações na disciplina de seminários, até as dificuldades externas ao mundo da pós-graduação.

Aos meus pais, Francisco e Marcia, e à minha irmã, Marcia Daniela, por todo o apoio desde a decisão de ingressar no doutorado.

Não posso deixar de agradecer à Amora, que, nos meus piores dias, forneceu suporte e me lembrou que existe alegria na vida.

A todos que de alguma maneira me ajudaram no desenvolvimento desse estudo, meu muito obrigada!

**It's just a spark but it's enough to keep me going
And when it's dark out and no one's around it keeps glowing
(Last Hope – Paramore)**

RESUMO

No presente estudo, biocarvões (biochar) foram preparados a partir da pirólise do bagaço de cana-de-açúcar, variando a temperatura final do processo entre 300 e 700 °C, e parte do material produzido foi quimicamente ativada com HNO₃. Nas caracterizações dos materiais, observou-se aumento da degradação com o aumento da temperatura final empregada na pirólise, além da presença de maior quantidade de grupos funcionais nos materiais produzidos sob as menores temperaturas. Verificou-se, ainda, que a ativação química resultou na oxidação e na nitração da estrutura carbonácea, aumentando, portanto, a quantidade de grupos funcionais nos materiais. Diferentes abordagens de construção de eletrodo e determinação de espécies de interesse, empregando os materiais produzidos, foram, então, investigadas. Inicialmente, os materiais foram utilizados como modificadores de eletrodos de pasta de carbono, que, por sua vez, foram aplicados na pré-concentração espontânea de íons Cu²⁺, seguida da determinação voltamétrica. O material BCA400 forneceu a resposta de maior intensidade de corrente de pico, comportamento que pode estar relacionado com a presença de maiores quantidades de grupos superficiais, como grupos oxigenados, conforme previamente caracterizado, favorecendo a interação com o analito. Utilizando este material como modificador e a técnica de voltametria de pulso diferencial, desenvolveu-se um método para determinação de Cu²⁺ em água de torneira. Estimou-se a região linear entre 1,0 e 15,0 µmol L⁻¹, com limite de detecção (LOD) de 0,36 µmol L⁻¹ e limite de quantificação de 1,09 µmol L⁻¹; esses parâmetros foram considerados adequados para a finalidade proposta, visto que possibilitaram a detecção e quantificação do analito, de acordo com o limite máximo estabelecido pela legislação vigente. O eletrodo contendo Cu²⁺ imobilizado também foi utilizado para o desenvolvimento de um método para determinação indireta de creatinina, via formação do complexo com o íon metálico e supressão do sinal voltamétrico do cobre. Neste caso, obteve-se faixa linear de trabalho na região entre 0,3 e 0,7 mmol L⁻¹, com LOD = 0,091 mmol L⁻¹ e LOQ = 0,30 mmol L⁻¹, valores que também foram considerados adequados para a finalidade proposta, que era a determinação do analito em amostras de urina sintética. Por fim, dispersões preparadas com os diferentes materiais foram utilizadas para modificar um eletrodo impresso de carbono, empregado como plataforma para a imobilização da proteína RBD do vírus SARS-CoV-2, via reação de ligação cruzada com EDC/NHS, para posterior aplicação na detecção de anticorpos contra o vírus em amostras de soro fortificadas. Para esta abordagem e aplicação, o material BC700 possibilitou a obtenção das respostas mais adequadas. O dispositivo construído utilizando esse carbonáceo foi capaz de diferenciar qualitativamente respostas de amostras positivas e negativas a presença do anticorpo, com base em um valor de corte de 82,3 %, em um nível de confiança de 95 %. Além disso, a plataforma foi seletiva para a detecção do analito mesmo na presença de um interferente e pode ser armazenada por até 7 dias sem perdas de performance. Sendo assim, a partir de materiais ambientalmente amigáveis, diferentes abordagens de detecção e determinação de espécies de interesse foram investigadas e a versatilidade do biochar como modificador na construção de (bio)sensores eletroquímicos foi demonstrada.

Palavras-chave: biochar, sensores eletroquímicos, imunossensores eletroquímicos, cobre, creatinina, SARS-CoV-2.

ABSTRACT

In this study, biochars were prepared from sugarcane bagasse, with pyrolysis temperature varying from 300 to 700 °C, and part of the material was chemically activated with HNO₃. Materials' characterization showed that degradation increased as the pyrolysis final temperature increased; in addition, a higher number of functional groups was observed for the materials produced under the lowest temperatures. Also, chemical activation resulted in oxidation and nitration of carbonaceous structure, increasing, therefore, the number of functional groups on the materials. Next, different approaches for electrode construction and analytes determination were investigated. First, materials were used as carbon paste electrodes modifiers, applied to spontaneous Cu²⁺ ions pre-concentration, followed by voltammetric determination. BCA400 material provided the most intense response for peak current, a behavior that may be related to the presence of the highest numbers of surface groups, as oxygen groups, as previously characterized, favoring its interaction with the analyte. Using this material and differential pulse voltammetry technique, a method for Cu²⁺ determination in tap water was developed. Linear range was estimated from 1.0 to 15.0 µmol L⁻¹, with limit of detection (LOD) of 0.36 µmol L⁻¹, and limit of quantification (LOQ) of 1.09 µmol L⁻¹; those parameters were considered suitable for the intended purpose, since they enabled the analyte detection and quantification, according to the maximum limit established by the current legislation. The electrode with immobilized Cu²⁺ was also used for developing a method for indirect creatinine determination, through complex formation with the metallic ion and suppression of copper voltammetric signal. In this case, linear working range from 0.3 to 0.7 mmol L⁻¹, LOD = 0.091 mmol L⁻¹ and LOQ = 0.30 mmol L⁻¹ were obtained, and also considered suitable for the intended purpose, that was analyte determination in synthetic urine samples. At last, dispersions prepared with the different materials were used to modify a screen-printed carbon electrode, employed as a platform for SARS-CoV-2 virus RBD-protein immobilization, through crosslinking reaction with EDC/NHS, for further application in detection of antibodies against the virus in spiked serum samples. For this approach, BC700 enabled the most suitable responses. The device constructed using this material was able to qualitatively differentiate responses from samples positive and negative to antibodies presence, based on a 82,3 % cutoff value, at 95 % confidence level. Additionally, the platform was selective for analyte detection even in presence of an interferent and could be stored up to 7 days without losses of its performance. Therefore, from environmentally friendly materials, different approaches for detection and determination of analytes were investigated, and biochar versatility as a modifier in electrochemical (bio)sensors construction was demonstrated.

Keywords: biochar, electrochemical sensors, electrochemical immunosensors, copper, creatinine, SARS-CoV-2.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA INTERNA INERTE E DOS GRUPOS SUPERFICIAIS QUE COMPÕEM O BIOCHAR.....	34
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS PRIMÁRIOS DE CONVERSÃO DOS CONSTITUINTES DA BIOMASSA.....	39
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DAS MUDANÇAS NA ESTRUTURA DO BIOCHAR COM O AUMENTO DA TEMPERATURA DE PIRÓLISE.....	41
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS E HETEROÁTOMOS COMUMENTE ENCONTRADOS EM BIOCHAR.....	43
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS DE INTERAÇÃO DO BIOCHAR COM ESPÉCIES ORGÂNICAS E INORGÂNICAS.....	44
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DOS ELEMENTOS QUE COMPÕEM UM SENSOR QUÍMICO.....	45
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO ENVOLVIDO NO MÉTODO DE DETECÇÃO LABEL-FREE.....	51
FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CREATININA.....	54
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA BÁSICA DO VÍRUS SARS-CoV-2.....	56
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DE PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	64
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO APARATO UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DO BIOCHAR A PARTIR DA PIRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	64
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO EMPREGADO PARA A OBTENÇÃO DO BIOCHAR ATIVADO.....	65

FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONSTRUÇÃO DO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO...	68
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO ADOTADO PARA REALIZAÇÃO DAS MEDIDAS VOLTAMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE(II).....	69
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO ADOTADO PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE CREATININA VIA SUPRESSÃO DO SINAL VOLTAMÉTRICO DE ÍONS COBRE (II).....	76
FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONSTRUÇÃO DO ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR.....	80
FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO UTILIZANDO O ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR.....	81
FIGURA 18 - CURVAS DE TG E DTG PARA O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, OBTIDAS EM ATMOSFERA DE N ₂ SOB TAXA DE AQUECIMENTO DE 5 °C min ⁻¹ , NA FAIXA DE TEMPERATURA DE 25 °C A 1000 °C.....	87
FIGURA 19 - CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS PARA O BIOCHAR, PRODUZIDO SOB AS DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE, E PARA O BIOCHAR ATIVADO, OBTIDAS EM ATMOSFERA DE N ₂ SOB TAXA DE AQUECIMENTO DE 5 °C min ⁻¹ , NA FAIXA DE TEMPERATURA DE 25 °C A 1000 °C.....	88
FIGURA 20 – IMAGENS DE MEV OBTIDAS PARA A BIOMASSA E AMOSTRAS DE BIOCHAR.....	90
FIGURA 21 – IMAGENS DE MEV OBTIDAS PARA OS DIFERENTES MATERIAIS (BIOCHAR E BIOCHAR ATIVADO), COM AUMENTO DE 400 VEZES.....	91
FIGURA 22 – ESPECTROS DE EDS DO BIOCHAR E BIOCHAR ATIVADO.....	92

FIGURA 23 –	ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS PARA A BIOMASSA E O BIOCHAR PRODUZIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE.....	93
FIGURA 24 –	ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS PARA O BIOCHAR PRODUZIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE E SUBMETIDO AO PROCEDIMENTO DE ATIVAÇÃO QUÍMICA.....	94
FIGURA 25 –	ESPECTROS DE FTIR DOS MATERIAIS BC400 E BCA400...	94
FIGURA 26 –	ESPECTRO RAMAN DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	98
FIGURA 27 -	ESPECTROS RAMAN PARA O GRAFITE, GRAFITE ATIVADO E BIOCHAR PRODUZIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE, NÃO ATIVADO E ATIVADO.....	99
FIGURA 28 –	GRÁFICO DE INTERVALOS DE RAZÃO VERSUS MATERIAL.....	100
FIGURA 29 -	VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E COMPARATIVO PERCENTUAL DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} , EMPREGANDO O ELETRODO DE PASTA DE CARBONO E OS ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO MODIFICADOS COM OS DIFERENTES MATERIAIS PRODUZIDOS; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	104
FIGURA 30 -	VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O ELETRODO DE PASTA DE CARBONO NÃO MODIFICADO E MODIFICADO COM BC400 E BCA400. AS LINHAS TRACEJADAS REPRESENTAM MEDIDAS FEITAS NA AUSÊNCIA DO ANALITO E AS LINHAS CHEIAS REPRESENTAM MEDIDAS PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0)	

- POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 5,0$), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 106
- FIGURA 31 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E COMPARATIVO DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDOS PARA O ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM BCA400, PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} EM ELETRÓLITO SUPORTE NÃO DESAERADO E DESAERADO POR 300 s COM N_2 ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 5,0$), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 107
- FIGURA 32 - VOLTAMOGRAMAS E COMPARATIVO DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 5,0$) APÓS PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) POR 5 min; PREVIAMENTE A VARREDURA VOLTAMÉTRICA, O ELETRODO FOI SUBMETIDO A UM POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s. LINHAS TRACEJADAS REPRESENTAM MEDIDAS FEITAS NA AUSÊNCIA DO ANALITO..... 108
- FIGURA 33 - VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} UTILIZANDO ETAPA DE PRÉ-CONDICIONAMENTO, COM APLICAÇÃO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, E VARREDURA DIRETA; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 5,0$), EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 110
- FIGURA 34 - VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS PARA MEDIDAS SUCESSIVAS DE DETERMINAÇÃO DE

100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,1 mol L^{-1} (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L^{-1} (pH = 5,0), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$); A SOLUÇÃO DE LEITURA DA CELA ELETROQUÍMICA FOI TROCADA ENTRE CADA MEDIDA..... 111

FIGURA 35 - VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS PARA MEDIDAS SUCESSIVAS DE DETERMINAÇÃO DE 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} UTILIZANDO POLIMENTO MECÂNICO E LIMPEZA ÁCIDA DA SUPERFÍCIE ELETRÓDICA ENTRE AS MEDIDAS; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,1 mol L^{-1} (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L^{-1} (pH = 5,0), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$); UM PROCEDIMENTO COMPLETO (PRÉ-CONCENTRAÇÃO + DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA) FOI REALIZADO PARA CADA MEDIDA DE DETERMINAÇÃO DO ANALITO..... 112

FIGURA 36 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVO DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDOS AO UTILIZAR DIFERENTES ELETRODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,1 mol L^{-1} (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L^{-1} (pH = 5,0), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 113

FIGURA 37 – INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO DE BIOCHAR COMO MODIFICADOR DE PASTA DE CARBONO VISANDO A

	DETERMINAÇÃO DE ÍONS $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	114
FIGURA 38 -	ESTUDO DA SOLUÇÃO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; TEMPO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	115
FIGURA 39 -	DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE COBRE (II) EM SOLUÇÃO AMONICAL EM FUNÇÃO DO pH.....	116
FIGURA 40 -	ESTUDO DO LIGANTE DA SOLUÇÃO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; TEMPO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	117
FIGURA 41 -	ESTUDO DA SOLUÇÃO DE LEITURA NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	118
FIGURA 42 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS POSSÍVEIS REAÇÕES QUE OCORREM NAS ETAPAS DE REDUÇÃO E REDISSOLUÇÃO NA DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE Cu^{2+}	118

- FIGURA 43 - ESTUDO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA DO ELETRODO NA CELA VOLTAMÉTRICA NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 3,0$) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 119
- FIGURA 44 - INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO E LARGURA DE PICO A MEIA ALTURA OBTIDOS PARA A INVESTIGAÇÃO DE DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 3,0$) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 120
- FIGURA 45 - INVESTIGAÇÃO DE DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 3,0$) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 121
- FIGURA 46 – INFLUÊNCIA DO POTENCIAL E DO TEMPO DE CONDICIONAMENTO NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 3,0$) EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 122
- FIGURA 47 - ESTUDO DA AMPLITUDE DO PULSO DIFERENCIAL PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE

	AMÔNIO 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 3,0) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $t_p = 200$ ms E $v = 10$ mV s ⁻¹	123
FIGURA 48 -	ESTUDO DO TEMPO DE PULSO NA DETERMINAÇÃO DE 100 μ mol L ⁻¹ DE Cu ²⁺ ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 3,0) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $a = 100$ mV E $v = 10$ mV s ⁻¹	124
FIGURA 49 -	DETERMINAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COBRE (II).....	125
FIGURA 50 -	COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO CONSTRUÍDAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA MATRIZ DE ÁGUA DE TORNEIRA.....	126
FIGURA 51 -	GRÁFICO DE RESÍDUOS.....	127
FIGURA 52 -	COMPARAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO RELATIVA PARA A DETERMINAÇÃO DE COBRE (II) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE INTERFERENTES.....	129
FIGURA 53 -	RESPOSTAS OBTIDAS PARA CADA DIA DO ESTUDO DA PRECISÃO PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ANALISADAS.....	130
FIGURA 54 -	VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL PARA MEDIDAS DE ADIÇÃO DE PADRÃO E CURVA DE ADIÇÃO DE PADRÃO (INSERIDA) OBTIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÍONS COBRE(II) EM ÁGUA DE TORNEIRA.....	131
FIGURA 55 -	VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVOS DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE 0,2 mmol L ⁻¹ DE CREATININA UTILIZANDO A ABORDAGEM	

DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE 0,1 mmol L⁻¹ DE Cu²⁺ EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,1 mol L⁻¹ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CRE EM SOLUÇÃO DE KCl 0,1 mol L⁻¹ POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L⁻¹ (pH = 3,0) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 135

FIGURA 56 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVOS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE 1,0 mmol L⁻¹ DE CREATININA UTILIZANDO A ABORDAGEM DE VARREDURA CATÓDICA; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE 0,5 mmol L⁻¹ DE Cu²⁺ EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,1 mol L⁻¹ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CRE EM SOLUÇÃO DE KCl 0,1 mol L⁻¹ POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L⁻¹ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 137

FIGURA 57 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO COBRE(II)-CREATININA NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE TRABALHO MODIFICADO COM BIOCHAR..... 138

FIGURA 58 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVOS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE CREATININA; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE 0,5 mmol L⁻¹ DE Cu²⁺ EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,1 mol L⁻¹ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CRE EM SOLUÇÃO DE KCl 0,1 mol L⁻¹ POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L⁻¹ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 138

- FIGURA 59 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVOS DE PERCENTUAL DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE CREATININA EMPREGANDO DIFERENTES VALORES DE pH DA SOLUÇÃO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO ANALITO; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE 0,5 mmol L⁻¹ DE Cu²⁺ EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,1 mol L⁻¹ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CRE POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L⁻¹ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100$ mV, $t_p = 200$ ms E $v = 10$ mV s⁻¹ 139
- FIGURA 60 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVOS DE PERCENTUAL DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE CREATININA EMPREGANDO DIFERENTES VALORES DE TEMPO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO ANALITO; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE 0,5 mmol L⁻¹ DE Cu²⁺ EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,1 mol L⁻¹ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE 1,0 mmol L⁻¹ de CRE EM SOLUÇÃO DE KCl 0,1 mol L⁻¹ POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L⁻¹ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100$ mV, $t_p = 200$ ms E $v = 10$ mV s⁻¹ 140
- FIGURA 61 - DETERMINAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CREATININA VIA SUPRESSÃO DO SINAL VOLTAMÉTRICO DE 0,5 mmol L⁻¹ DE ÍONS COBRE (II)..... 142
- FIGURA 62 - DETERMINAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CREATININA VIA SUPRESSÃO DO SINAL VOLTAMÉTRICO DE 0,1 mmol L⁻¹ DE ÍONS COBRE (II)..... 143
- FIGURA 63 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CREATININA, NA PRESENÇA DA MATRIZ DE URINA SINTÉTICA; PRÉ-CONCENTRAÇÃO

	DE 0,1 mmol L ⁻¹ DE Cu ²⁺ EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CRE EM SOLUÇÃO DE KCl 0,1 mol L ⁻¹ CONTENDO A MATRIZ POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100$ mV, $t_p = 200$ ms E $v = 10$ mV s ⁻¹	144
FIGURA 64 -	COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CREATININA CONSTRUÍDAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA MATRIZ DE URINA SINTÉTICA.....	145
FIGURA 65 -	GRÁFICO DE RESÍDUOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CREATININA.....	146
FIGURA 66 -	COMPARAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO RELATIVA PARA A DETERMINAÇÃO DE CREATININA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE INTERFERENTES.....	148
FIGURA 67 -	RESPOSTAS OBTIDAS PARA CADA DIA DO ESTUDO DA PRECISÃO PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CREATININA ANALISADAS.....	149
FIGURA 68 -	VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL PARA MEDIDAS DE ADIÇÃO DE PADRÃO E CURVA DE ADIÇÃO DE PADRÃO (INSERIDA) OBTIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE CREATININA EM URINA SINTÉTICA.....	150
FIGURA 69 -	VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E MÉDIAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DA SONDA [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR (2,0 mmol L ⁻¹ DE [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} EM PBS; $v = 50$ mV s ⁻¹), UTILIZANDO BC300, BC400 E BC500 COMO MODIFICADORES DE ELETRODO..	155
FIGURA 70 -	VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E MÉDIAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS NA	

	AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DA SONDA $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR (2,0 mmol L ⁻¹ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$), UTILIZANDO BC600, BC700 E BCA400 COMO MODIFICADORES DE ELETRODO.....	156
FIGURA 71 -	VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E MÉDIAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DA SONDA $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR (2,0 mmol L ⁻¹ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$), UTILIZANDO BCA500, BCA600 E BCA700 COMO MODIFICADORES DE ELETRODO.....	157
FIGURA 72 –	ESPECTROS DE FTIR DOS MATERIAIS BC600 E BC700.....	159
FIGURA 73 –	VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE MEDIDAS SUCESSIVAS OBTIDOS PARA A SONDA $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ APÓS A REAÇÃO DE LIGAÇÃO CRUZADA COM EDC/NHS PARA SPE E SPE-BC700 (2,0 mmol L ⁻¹ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....	160
FIGURA 74 –	VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DA SONDA $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR (2,0 mmol L ⁻¹ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....	161
FIGURA 75 –	RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA SONDA OBTIDAS, PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO DO PAR EDC/NHS, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO (2,0 mmol L ⁻¹ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....	162
FIGURA 76 –	RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA SONDA, OBTIDAS PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO DE RBD, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS	

	A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO (2,0 mmol L ⁻¹ DE [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....	163
FIGURA 77 –	RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA SONDA, OBTIDAS PARA AS DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO DE RBD, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO (2,0 mmol L ⁻¹ DE [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....	164
FIGURA 78 –	RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA SONDA, OBTIDAS PARA A INCUBAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE RBD, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO E CORRELAÇÃO ENTRE O LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO DE RBD E A CORRENTE DE DETECÇÃO NORMALIZADA (2,0 mmol L ⁻¹ DE [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....	165
FIGURA 79 –	RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA SONDA, OBTIDAS PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO DE Ab, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO (2,0 mmol L ⁻¹ DE [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....	166
FIGURA 80 –	RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA SONDA, OBTIDAS PARA AS DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO DE Ab, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO (2,0 mmol L ⁻¹ DE [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....	167
FIGURA 81 -	VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DA SONDA [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR (2,0 mmol L ⁻¹ DE [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} EM PBS);	

- CV: $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; DPV: POTENCIAL DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE -0,4 V POR 10 s, $a = 150 \text{ mV}$, $t_p = 500 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$)..... 168
- FIGURA 82 – RESPOSTAS OBTIDAS PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2 EM SORO COMERCIAL E SORO COMERCIAL FORTIFICADO, UTILIZANDO VOLUME E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE BSA DE $5 \mu\text{L}$ E $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS, POTENCIAL DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE -0,4 V POR 10 s, $a = 150 \text{ mV}$, $t_p = 500 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$)..... 169
- FIGURA 83 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E RESPOSTAS OBTIDAS PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2 EM SORO COMERCIAL E SORO COMERCIAL FORTIFICADO, UTILIZANDO VOLUME E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE BSA DE $7,5 \mu\text{L}$ E $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS, POTENCIAL DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE -0,4 V POR 10 s, $a = 150 \text{ mV}$, $t_p = 500 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$)..... 170
- FIGURA 84 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL PARA A DETECÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2 EM SORO COMERCIAL FORTIFICADO ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS, POTENCIAL DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE -0,4 V POR 10 s, $a = 150 \text{ mV}$, $t_p = 500 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$)..... 170
- FIGURA 85 – COMPARATIVO DAS RESPOSTAS OBTIDA PARA A AMOSTRA DE SORO NEGATIVO E PARA A DETECÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2 EM SORO COMERCIAL FORTIFICADO ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS, POTENCIAL DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE -0,4 V POR 10 s, $a = 150 \text{ mV}$, $t_p = 500 \text{ ms}$ $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$) E REPRESENTAÇÃO DO VALOR DE CORTE

	ESTABELECIDO PARA A DETECÇÃO QUALITATIVA DO ANALITO.....	171
FIGURA 86 –	AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DO IMUNOSSENSOR: MÉDIA DE % I_{pa} PARA AMOSTRAS DE SORO NEGATIVO E AMOSTRAS DE SORO FORTIFICADAS COM ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA SARS-CoV-2 (Ab-RBD), ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA FEBRE AMARELA (Ab-FA) E UMA MISTURA DE AMBOS. A LINHA TRACEJADA INDICA O VALOR DE CORTE.....	172
FIGURA 87 –	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO IMUNOSSENSOR: MÉDIA DE % I_{pa} PARA AMOSTRAS DE SORO FORTIFICADAS COM ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA SARS-CoV-2 APÓS DIFERENTES DIAS DE ARMAZENAMENTO DO DISPOSITIVO. A LINHA TRACEJADA INDICA O VALOR DE CORTE.....	173

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	REAGENTES UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS FÓRMULAS QUÍMICAS, PUREZA E PROCEDÊNCIA, RELATIVOS AO PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	62
TABELA 2 -	RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOCHAR EM DIFERENTES TEMPERATURAS FINAIS DE PIRÓLISE.....	86
TABELA 3 -	GRUPAMENTOS ÁCIDOS TOTAIS PRESENTES NO BIOCHAR PRODUZIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE, NÃO ATIVADO E ATIVADO.....	96
TABELA 4 -	VALORES DE I_D/I_G PARA O BIOCHAR PRODUZIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE, NÃO ATIVADO E ATIVADO.....	99
TABELA 5 -	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS AVALIADAS E OTIMIZADAS PARA OS PARÂMETROS RELACIONADOS À DETERMINAÇÃO DE Cu^{2+}	125
TABELA 6 -	REGRESSÃO LINEAR PARA A CURVA ANALÍTICA DA DETERMINAÇÃO DE Cu^{2+}	127
TABELA 7 -	DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE Cu^{2+} EM ÁGUA DE TORNEIRA UTILIZANDO ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO MODIFICADOS.....	128
TABELA 8 -	DESVIOS PADRÃO RELATIVOS PARA A ESTIMATIVA DA PRECISÃO.....	130
TABELA 9 -	DETERMINAÇÃO DE ÍONS COBRE(II) EM ÁGUA DE TORNEIRA: CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS E RECUPERAÇÃO.....	131
TABELA 10 -	REGRESSÃO LINEAR PARA A CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE CREATININA.....	146
TABELA 11 -	DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE CREATININA EM URINA.....	147
TABELA 12 -	DESVIOS PADRÃO RELATIVOS PARA A ESTIMATIVA DA PRECISÃO NA DETERMINAÇÃO DE CREATININA.....	149

TABELA 13 - DETERMINAÇÃO DE CREATININA EM URINA: CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS E RECUPERAÇÃO....	150
TABELA 14 – COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2 UTILIZANDO OS DIFERENTES MATERIAIS NA CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.....	158
TABELA 15 – PLATAFORMA, TÉCNICA, TEMPO PARA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR, ESTABILIDADE E MENOR VALOR DETECTÁVEL PARA MÉTODOS ELETROQUÍMICOS DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2, BASEADOS EM PLATAFORMAS MODIFICADAS COM MATERIAIS CARBONÁCEOS.....	173

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Ab: anticorpo, do inglês *antibody*

ANOVA: análise de variância

BSA: albumina de soro bovino, do inglês, *bovine serum albumine*

CRE: creatinina

CV: voltametria cíclica, do inglês *cyclic voltammetry*

DPR: desvio-padrão relativo

DPV: voltametria de pulso diferencial, do inglês *differential pulse voltammetry*

EDC: Hidroclorato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EDS: espectroscopia de energia dispersiva

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*

E_{pa} : potencial de pico anódico

E_{pc} : potencial de pico catódico

EPCM: eletrodo de pasta de carbono modificado

EQM: eletrodo quimicamente modificado

FTIR: espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

GCE: eletrodo de carbono vítreo, do inglês *glassy carbon electrode*

GM/MS: Gabinete do Ministro/Ministério da Saúde

Ig: imunoglobulina

I_{pa} : corrente de pico anódico

I_{pc} : corrente de pico catódico

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LOD: limite de detecção

LOQ: limite de quantificação

LSV: voltametria de varredura linear, do inglês *linear sweep voltammetry*

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MM: massa molecular

NHS: sal sódico de N-hidroxisulfosuccinimida

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: tampão fosfato salino, do inglês, *phosphate buffer saline*

RBD: domínio de ligação do receptor, do inglês *receptor binding domain*

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa, do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*

SPE: eletrodo de carbono impresso, do inglês *screen-printed carbon electrode*

SWV: voltametria de onda quadrada, do inglês *square-wave voltammetry*

$W_{1/2}$: largura de pico à meia altura

SUMÁRIO

NOTA SOBRE A APRESENTAÇÃO DA TESE.....	32
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	33
1.1 BIOCHAR.....	34
1.1.1 Influência da Matéria-Prima Utilizada na Produção do Biochar.....	35
1.1.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar.....	37
1.1.2 Influência das Condições do Processo de Pirólise na Produção do Biochar.....	38
1.1.3 Influência dos Tratamentos de Ativação nas Características Físico-Químicas do Biochar.....	41
1.1.4 Interação do Biochar com Espécies Orgânicas e Inorgânicas.....	43
1.2 SENSORES ELETROQUÍMICOS.....	44
1.2.1 Utilização de Biochar na Construção de Eletrodos Quimicamente Modificados.....	46
1.2.2 Imunossensores Eletroquímicos.....	49
1.3 ANALITOS INVESTIGADOS.....	51
1.3.1 Íons Cobre (II).....	52
1.3.2 Creatinina.....	53
1.3.3 Anticorpos Contra o Vírus SARS-CoV-2.....	56
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	59
2.1 OBJETIVO GERAL.....	60
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	62
3.2 OBTENÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA.....	63
3.3 PRODUÇÃO DO BIOCHAR.....	64
3.4 ATIVAÇÃO DO BIOCHAR.....	65
3.5 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCHAR E BIOCHAR ATIVADO.....	65
3.5.1 Termogravimetria.....	65
3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva.....	66
3.5.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier.....	66
3.5.4 Estimativa de Grupos Ácidos Superficiais.....	66
3.5.5 Espectroscopia Raman.....	67

3.6	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÍONS COBRE (II) UTILIZANDO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR.....	67
3.6.1	Construção dos Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados.....	67
3.6.2	Medidas Voltamétricas.....	68
3.6.3	Avaliação da Composição da Pasta de Carbono Modificada.....	70
3.6.4	Avaliação das Soluções de Pré-Concentração e Leitura.....	71
3.6.5	Avaliação do Potencial e do Tempo de Condicionamento.....	72
3.6.6	Estudo dos Parâmetros Instrumentais da Voltametria de Pulso Diferencial.....	72
3.6.7	Estimativa dos Parâmetros de Validação para a Determinação de Cu^{2+} em Água de Torneira.....	72
3.7	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CREATININA UTILIZANDO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR E ÍONS COBRE (II).....	75
3.7.1	Instrumentação.....	75
3.7.2	Procedimento de Determinação de Creatinina via Supressão do Sinal Voltamétrico dos Íons Cu^{2+}	75
3.7.3	Avaliação do pH da Solução de Pré-Concentração de Creatinina.....	77
3.7.4	Avaliação do Tempo de Pré-Concentração de Creatinina.....	77
3.7.5	Avaliação da Concentração de Íons Cu^{2+} Imobilizados no Eletrodo de Trabalho.....	77
3.7.6	Estimativa dos Parâmetros de Validação para a Determinação de Creatinina em Urina Sintética.....	77
3.8	DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS SARS-COV-2 UTILIZANDO ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR.....	79
3.8.1	Medidas Voltamétricas.....	79
3.8.2	Modificação do Eletrodo Impresso de Carbono com a Suspensão de Biochar..	80
3.8.3	Construção do Imunossensor Eletroquímico.....	81
3.8.4	Estimativa dos Parâmetros Analíticos para a Detecção de Anticorpos Contra o Vírus SARS-CoV-2 em Amostra de Soro Comercial.....	82
	CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84

SEÇÃO 4.1: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCHAR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	85
4.1.1 Rendimento da Produção de Biochar.....	86
4.1.2 Termogravimetria.....	87
4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	89
4.1.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva.....	92
4.1.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier.....	93
4.1.6 Estimativa de Grupos Ácidos Superficiais.....	96
4.1.7 Espectroscopia Raman.....	97
4.1.8 Conclusões Parciais.....	101
SEÇÃO 4.2: DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ÍONS COBRE (II) UTILIZANDO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR.....	103
4.2.1 Avaliação da Potencialidade de Pré-Concentração de Cu^{2+} pelos Diferentes Materiais para Posterior Determinação Voltamétrica.....	104
4.2.2 Definição da Técnica Voltamétrica para Determinação de Cu^{2+}	108
4.2.3 Influência da Composição da Pasta de Carbono na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}	113
4.2.4 Influência da Solução de Pré-Concentração na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}	114
4.2.5 Influência da Solução de Leitura na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}	117
4.2.6 Influência do Tempo de Pré-Concentração na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}	120
4.2.7 Influência do Potencial e do Tempo de Condicionamento na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}	122
4.2.8 Influência dos Parâmetros Instrumentais da Voltametria de Pulso Diferencial na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}	123
4.2.9 Estimativa dos Parâmetros de Validação para a Determinação Voltamétrica de Cu^{2+} em Água de Torneira.....	125
4.2.10 Conclusões Parciais.....	132
SEÇÃO 4.3: DETERMINAÇÃO DE CREATININA EM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR E ÍONS COBRE (II).....	134
4.3.1 Avaliação da Determinação de Creatinina via Supressão do Sinal Voltamétrico de Íons Cu^{2+}	135

4.3.2	Avaliação do pH da Solução de Pré-Concentração de Creatinina.....	139
4.3.3	Avaliação do Tempo de Pré-Concentração de Creatinina.....	140
4.3.4	Efeito da Concentração de Íons Cu^{2+} Imobilizados no Eletrodo de Trabalho na Determinação de Creatinina.....	141
4.3.5	Estimativa dos Parâmetros de Validação para a Determinação de Creatinina em Urina Sintética.....	144
4.3.6	Conclusões Parciais.....	151
SEÇÃO 4.4: IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS SARS-CoV-2 UTILIZANDO UM ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR.....		153
4.4.1	Avaliação dos Diferentes Materiais como Modificadores de Eletrodo Impresso para a Construção do Imunossensor Eletroquímico.....	154
4.4.2	Influência do Tempo de Incubação do Agente de Ligação Cruzada na Resposta do Imunossensor Eletroquímico.....	162
4.4.3	Influência do Tempo e Temperatura de Incubação e da Concentração da Proteína Viral na Resposta do Imunossensor Eletroquímico.....	163
4.4.4	Influência do Tempo e Temperatura de Incubação do Analito na Resposta do Imunossensor Eletroquímico.....	166
4.4.5	Avaliação da Voltametria de Pulso Diferencial como Técnica de Detecção.....	167
4.4.6	Estimativa dos Parâmetros Analíticos para a Detecção de Anticorpos Contra o Vírus SARS-CoV-2 em Amostras de Soro Comercial.....	168
4.4.7	Conclusões Parciais.....	174
CONCLUSÃO GERAL.....		175
REFERÊNCIAS.....		177
APÊNDICE 1 – INFORMAÇÕES ACADÊMICAS: DISCIPLINAS CURSADAS E CONCEITOS.....		193
APÊNDICE 2 – PRODUÇÃO ACADÊMICA.....		194

NOTA SOBRE A APRESENTAÇÃO DA TESE

A produção de biochar a partir do bagaço de cana-de-açúcar, empregando diferentes temperaturas finais de pirólise e posterior procedimento de ativação química, bem como a aplicação dos diferentes materiais obtidos como modificadores de eletrodo foram investigadas. Neste sentido, os diferentes materiais foram caracterizados e utilizados na construção de eletrodos de pasta de carbono modificados e de eletrodos impressos de carbono modificados, os quais foram empregados em diferentes abordagens de determinação eletroanalítica de espécies de interesse.

As diferentes etapas relativas ao desenvolvimento do estudo desta Tese de Doutorado foram divididas em quatro capítulos, a saber:

- **Capítulo 1:** introdução, contendo revisão bibliográfica;
- **Capítulo 2:** descrição dos objetivos gerais e específicos do estudo;
- **Capítulo 3:** materiais e métodos empregados durante o desenvolvimento do estudo;
- **Capítulo 4:** resultados e discussão, divididos em quatro seções:
 - **Seção 4.1:** caracterizações do biochar e biochar ativado;
 - **Seção 4.2:** uso dos materiais produzidos como modificadores de eletrodos de pasta de carbono, visando pré-concentração espontânea de Cu^{2+} , seguido de determinação voltamétrica, e uso desta abordagem no desenvolvimento de um método para determinação do analito em água de torneira;
 - **Seção 4.3:** uso do eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar contendo íons Cu^{2+} imobilizados no desenvolvimento de um método de determinação indireta de creatinina, via formação de complexo com o íon metálico e supressão do sinal voltamétrico do cobre, com aplicação em amostra de urina sintética;
 - **Seção 4.4:** uso de dispersões dos diferentes materiais para modificar eletrodos impressos de carbono, utilizados como plataforma para a imobilização da proteína RBD do vírus SARS-CoV-2, visando a construção de um imunossensor eletroquímico para detecção de anticorpos contra o vírus em amostras de soro fortificadas.

Apresenta-se, ainda, a conclusão final acerca do desenvolvimento do trabalho, bem como as referências utilizadas para dar suporte teórico às discussões propostas, informações acadêmicas sobre as disciplinas cursadas e produção científica.

CAPÍTULO 1:
INTRODUÇÃO

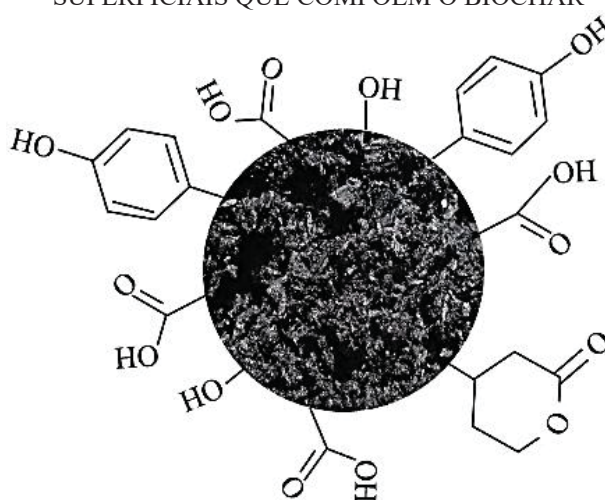
1.1 BIOCHAR

O biochar é um material carbonáceo produzido a partir da decomposição térmica da matéria orgânica sob condições de suprimento limitado de oxigênio (O₂). O interesse na produção e utilização deste material se deve especialmente a descoberta que substâncias similares ao biochar são responsáveis pela alta fertilidade das chamadas *Terras Pretas de Índio*, encontradas na Amazônia, devido a maior estabilidade e capacidade de manter nutrientes que este carbonáceo possui, se comparado a outros tipos de matéria orgânica presentes no solo.^{1,2}

O papel que o biochar desempenha na gestão ambiental tem tornado este material cada vez mais atrativo. Neste sentido, a produção do biochar contribui para o gerenciamento de resíduos, dando-lhes uma aplicabilidade em detrimento ao descarte. Ademais, indiretamente, este processo pode ajudar na mitigação das mudanças climáticas devido a diminuição das emissões de metano de aterros e da energia usada no transporte de longa distância de resíduos, por exemplo.¹ Sendo assim, a produção do material vai de encontro aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável estabelecidos pelas Nações Unidas, em especial as metas 12 e 13, que visam, respectivamente, assegurar padrões de produção e consumo sustentáveis e tomar ações para combater as mudanças climáticas.³

De modo geral, o biochar apresenta estrutura interna inerte, predominante de carbono amorfo, e na sua superfície há a presença de diversos grupos funcionais, tal qual grupos oxigenados, conforme representado na Figura 1.²

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA INTERNA INERTE E DOS GRUPOS SUPERFICIAIS QUE COMPÕEM O BIOCHAR



FONTE: Adaptado de Rezende *et al.*²

As características físico-químicas do biochar, em termos de capacidade adsortiva, área superficial específica, porosidade e capacidade de troca iônica, por exemplo, influenciam diretamente a aplicação na qual o material pode ser empregado.² Essas propriedades dependem, primariamente, da matéria-prima (biomassa) utilizada na produção do carbonáceo, bem como das condições empregadas no processo de decomposição térmica (pirólise) e da aplicação de tratamentos posteriores do biochar.¹ Sendo assim, estas variáveis serão discutidas com mais detalhes na sequência.

1.1.1 Influência da Matéria-Prima Utilizada na Produção do Biochar

Diversos tipos de matéria-prima podem ser utilizados na produção do biochar, como a biomassa terrestre e aquática,⁴⁻⁶ resíduos municipais^{7,8} e resíduos agropecuários.^{9,10} Este último inclui os resíduos de culturas agrícolas, que são a matéria orgânica deixada para trás após a realização da colheita ou após o processamento para a finalidade requerida. Deste modo, os resíduos de culturas agrícolas englobam cascas, sementes, bagaços, melaços e raízes, advindos de cereais, gramíneas, vegetais e frutas, por exemplo,¹¹ ou seja, derivados de biomassa lignocelulósica.

A biomassa lignocelulósica é constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polímero de condensação linear, cuja unidade de repetição é a celobiose, um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose unidas por uma ligação β -(1 \rightarrow 4) glicosídica. As cadeias poliméricas da celulose se conectam por ligações de hidrogênio entre grupos hidroxila, em um arranjo organizado. As diferentes camadas dispostas no plano se organizam, então, umas sobre as outras, de modo a formar partículas tridimensionais que se agregam em microfibrilas. Assim, constitui-se um arranjo cristalino que confere à celulose recalcitrância para degradação biológica e química, via hidrólise ácida ou enzimática, por exemplo, e maior resistência a decomposição térmica.^{1,11,12}

A hemicelulose, por sua vez, compreende heteropolímeros ramificados, compostos de esqueletos de pentoses e/ou hexoses conectados por ligações glicosídicas. Nas biomassas lignocelulósicas, ela encontra-se intercalada às microfibrilas de celulose, promovendo elasticidade. Os açúcares base da estrutura da hemicelulose incluem xilose, manose, glicose, galactose, ramnose, fucose, ácido galacturônico e ácido glicurônico. Deste modo, a estrutura da hemicelulose varia dependendo da sua localização na parede celular, do tipo de célula e da espécie que compõe. Isso confere a este componente falta de cristalinidade, fazendo com que sua estabilidade química e térmica seja menor que a da celulose.^{1,11,12}

Já a lignina compõe a maior fração não-carboidrato da lignocelulose, sendo constituída por um polímero baseado em fenilpropano, a partir de três monômeros: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool cumarílico. Este componente é formado por meio de diversos tipos de interligações entre as unidades individuais, possuindo, portanto, estrutura amorfa. A lignina associa-se, via ligações covalentes, aos carboidratos que compõem a biomassa lignocelulósica, formando uma espécie de capa protetora que envolve as cadeias de celulose e hemicelulose. Uma vez inserido nas paredes celulares, este componente assegura a impermeabilidade dos vasos condutores de seiva e contribui para a rigidez da parede celular e recalcitrância da lignocelulose.^{1,11,12}

Materiais de plantas também contém os chamados extrativos, compostos orgânicos que não estão quimicamente ligados aos componentes da biomassa, como, por exemplo, resinas, ácidos graxos e compostos fenólicos. Apesar de não representarem interferência significativa no rendimento do biochar, devido às baixas concentrações, os extrativos podem influenciar o perfil de emissão gasoso durante a decomposição térmica.^{1,11}

Ademais, nutrientes elementares inorgânicos, como nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), cloro (Cl), silício (Si), metais alcalino-terrosos e metais de transição podem compor a biomassa. Estes elementos podem, ainda, permanecer no produto gerado após a oxidação ou degradação térmica da biomassa em altas temperaturas, sendo incluídos, nesse caso, no conteúdo inorgânico conhecido como cinzas. Reações de fusão ou sinterização destas, por sua vez, podem implicar em alterações na estrutura do biochar produzido, em termos de porosidade, por exemplo.¹

Uma variação considerável nas quantidades de celulose, hemicelulose e lignina entre diferentes tipos de biomassa e até mesmo entre uma mesma espécie, a depender do tipo do solo, condições climáticas e estágio no qual foi realizada a colheita, pode ocorrer. Cada um desses componentes possui comportamento térmico distinto, logo, há necessidade de diferentes faixas de temperatura para a ocorrência dos seus respectivos processos de decomposição térmica. Considerando uma taxa de aquecimento lenta ($10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$), a biomassa lignocelulósica apresenta, basicamente, quatro etapas de perda de massa acentuada, referentes à degradação dos seus componentes:

- (1) A decomposição térmica da biomassa tem início com reações de desidratação, relativas à perda de umidade quimicamente ligada, em temperaturas entre $120 - 150\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- (2) Em temperaturas entre $200 - 260\text{ }^{\circ}\text{C}$, ocorre a degradação da hemicelulose;
- (3) A celulose é degradada em temperaturas entre $240 - 350\text{ }^{\circ}\text{C}$;

(4) A degradação da lignina começa em temperaturas acima de 280 °C, em um processo lento e constante que pode se estender a temperaturas que chegam a 900 °C.¹

Reitera-se que as proporções destes componentes, que podem variar para cada biomassa, vão influenciar o grau de reatividade, logo, faixas de temperatura relativamente deslocadas, mais alargadas ou mais estreitas, relacionadas aos respectivos processos de degradação térmica, podem ser observadas a depender da natureza da matéria-prima. Sendo assim, de modo geral, o biochar vai possuir um esqueleto de carbono base que retém a porosidade rudimentar e a estrutura apresentada pela biomassa, cujas características finais vão depender, ainda, das condições empregadas para a produção do material.¹

1.1.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene do gênero *Saccharum*, nativa das regiões tropicais do Sul da Ásia e da Melanésia, que foi trazida ao Brasil pelos portugueses, no século XVI. No país, a planta encontrou fatores, como solo férteis, disponibilidade de água e temperatura e relevo adequados, que favoreceram o seu desenvolvimento, tornando-a uma das principais culturas agrícolas locais.^{13,14}

Basicamente, a planta da cana-de-açúcar é constituída por duas partes: uma subterrânea, que compreende as raízes e rizomas, e outra aérea, que inclui os colmos, folhas e flores. Do colmo, extrai-se o caldo a partir do qual se inicia a produção do açúcar e do álcool.¹³ Na produção do açúcar, mais especificamente, a cana é esmagada em uma série de moinhos para a extração do caldo. Nesse processo, forma-se um resíduo fibroso, chamado de bagaço de cana-de-açúcar. Fatores como clima, solo e localização geográfica do cultivo vão influenciar a composição química deste subproduto, porém, de modo geral, ele é formado por 50 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 25 % de lignina.^{15,16}

Estima-se a geração de cerca de 280 – 300 quilos de bagaço por tonelada de cana processada.^{15,16} Desta forma, o reaproveitamento deste resíduo se mostra relevante no contexto do Brasil, visto que o país é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo esperado a produção de 572.874,9 mil toneladas na safra 2022/2023.¹⁷

Tradicionalmente, o bagaço tem sido utilizado como combustível para caldeiras em fábricas de açúcar. Porém, há desvantagens associadas a essa aplicação, como o baixo poder calorífico do bagaço, que prejudica a eficiência energética do processo, e a fumaça liberada na atmosfera, que necessita de monitoramento constante para assegurar a adequabilidade com relação aos padrões de qualidade do ar. O bagaço de cana-de-açúcar também tem sido

empregado, em menor proporção, na produção do etanol; entretanto, devido ao baixo nível de açúcares deixados no resíduo após a extração do caldo, a eficiência desse processo também é baixa.¹⁸ Sendo assim, ainda há um nicho a ser explorado quanto ao reaproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar, de modo a se encontrar um processo que seja mais favorável, em termos de eficiência energética, e cuja aplicação, preferencialmente, seja ambientalmente amigável.

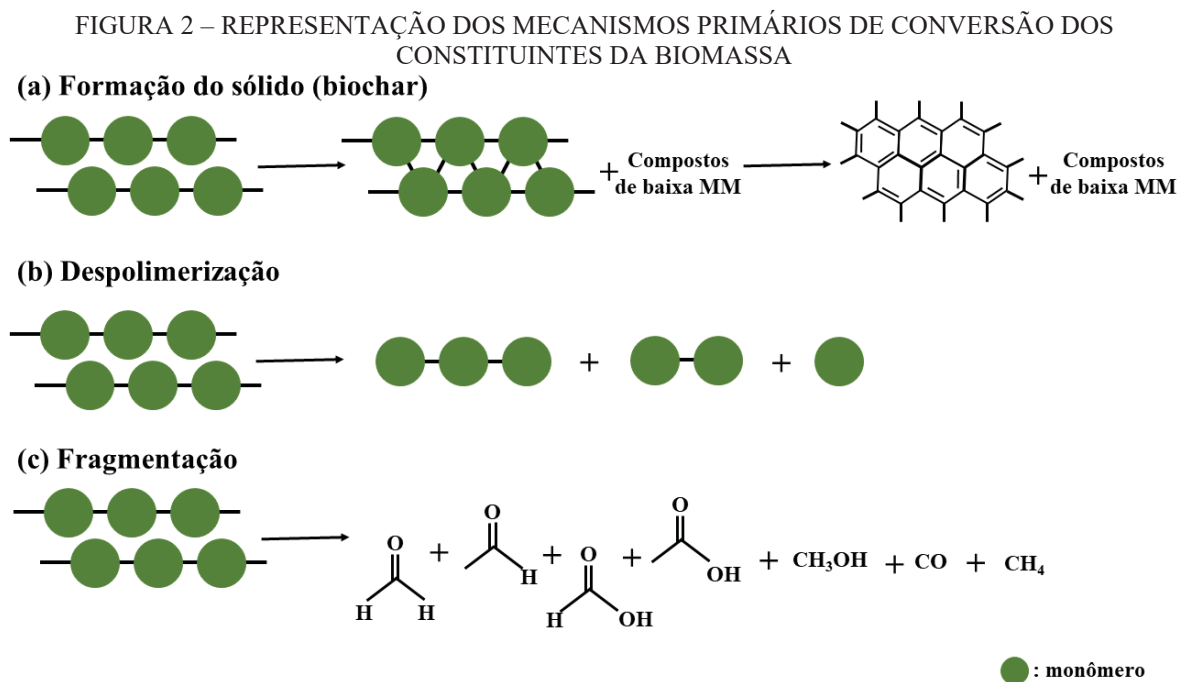
Uma alternativa é a utilização do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de biochar. Nesse sentido, Khan *et al.*¹⁹ e Nie *et al.*²⁰ mostraram a potencialidade deste material na remediação de solos contaminados por cobre, cromo e chumbo. Ademais, Silva *et al.*²¹ utilizaram o biochar obtido desta matéria-prima para sorção do herbicida clomazone em solo, enquanto Ma *et al.*²² utilizaram o carbonáceo combinado com ferro e zinco, e ativado com KOH, para a remoção do inseticida imidacloprid em água. Assim, nota-se a potencialidade do biochar produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar em interagir com compostos orgânicos e inorgânicos.

1.1.2 Influência das Condições do Processo de Pirólise na Produção de Biochar

Além da influência da matéria-prima sobre a natureza do biochar a ser produzido, o grau de alteração da estrutura original da biomassa, por meio do rearranjo microestrutural, do desgaste durante o processamento e da formação de craqueamento, será dependente das condições empregadas no processo de degradação térmica. Estes processos incluem a conversão hidrotermal, a torrefação, a gaseificação, a pirólise rápida (*fast pyrolysis*) e a pirólise lenta (*slow pyrolysis*). As distinções entre eles se baseiam, em suma, na presença ou ausência de água no meio reacional, no tempo de permanência e na taxa de aquecimento da matéria-prima, no ambiente gasoso no qual a reação se processa (ausência ou presença de O₂, N₂ ou vapor) e nas temperaturas e pressões usadas.¹

Em linhas gerais, na pirólise, a decomposição térmica da biomassa ocorre pelo aquecimento da matéria-prima na ausência ou sob fornecimento limitado de O₂. Sob estas condições, formam-se três tipos de produtos: sólido (biochar), gases não condensáveis (majoritariamente CO, CO₂, CH₄ e H₂) e gases condensáveis (líquido ou alcatrão, compostos por uma mistura de compostos aromáticos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos).^{1,12} Collard e Blin¹² descrevem detalhadamente os produtos formados a partir da decomposição térmica, via pirólise, de cada componente lignocelulósico, bem como os mecanismos das respectivas reações, divididas em mecanismos primários e reações secundárias. Os

mecanismos primários incluem reações que ocorrem a partir da quebra das ligações químicas dos constituintes da biomassa, durante o processo de aquecimento, e que resultam na liberação de compostos voláteis e em reações de rearranjo da matriz carbonácea. Eles englobam basicamente três caminhos reacionais principais, dependentes da natureza das ligações químicas que são quebradas, cujas representações esquemáticas são apresentadas na Figura 2:



FONTE: Adaptado de Collard e Blin.¹²

- (1) *Formação do sólido (biochar)*: neste caminho, ocorrem reações de rearranjo intra- e intermoleculares, formando anéis benzênicos que se combinam em uma estrutura policíclica. Geralmente, há também a liberação de compostos de baixa massa molecular (MM), como moléculas de água e gases não condensáveis. Assim, produz-se um material com maior grau de reticulação do que a matéria-prima, cuja estabilidade térmica é mais elevada;
- (2) *Despolimerização*: consiste na quebra de ligações entre os monômeros que compõem os biopolímeros (celulose, hemicelulose e lignina). Este processo resulta na diminuição do grau de polimerização das cadeias, produzindo moléculas, no geral, condensáveis a temperatura ambiente, encontradas na fração líquida dos produtos na forma de derivados monoméricos, diméricos ou triméricos;

(3) *Fragmentação*: ocorre entre as ligações covalentes do polímero, mesmo entre unidades monoméricas, e leva a formação de gases não condensáveis e compostos orgânicos de cadeia curta condensáveis a temperatura ambiente.¹²

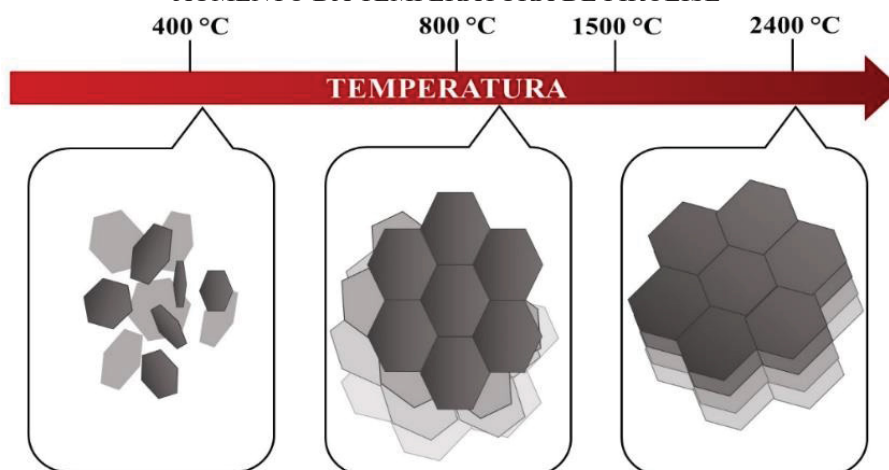
Por sua vez, as reações secundárias englobam conversões adicionais que alguns compostos voláteis instáveis podem passar após a formação, incluindo reações de craqueamento e recombinação. No craqueamento, as ligações dos compostos voláteis são quebradas e moléculas de menor massa molecular são produzidas, levando a formação de produtos similares àqueles obtidos pelo mecanismo primário de fragmentação. Por outro lado, a recombinação consiste na união de compostos voláteis para formar uma molécula de maior massa molecular, que deixa de ser volátil a temperatura ambiente.¹²

Em suma, a ocorrência preferencial de um dos mecanismos reacionais de decomposição térmica da biomassa e, por consequência, a fração de cada produto formado, pode variar de acordo com os parâmetros empregados no processo, em termos de temperatura final, taxa de aquecimento, tempo de residência, pressão, ambiente gasoso, tipo de reator, entre outros.^{1,12}

A temperatura final é o parâmetro que desempenha a influência mais significativa nos produtos da pirólise. Basicamente, o mecanismo primário de formação de sólido é dominante até temperaturas finais de pirólise de 300 °C. Conforme a temperatura é aumentada, os demais caminhos reacionais - despolimerização e fragmentação - passam a ganhar importância e seus respectivos produtos, na forma de compostos voláteis condensáveis e não condensáveis, vão sendo gerados; ou seja, o rendimento em termos da produção de biochar diminui.^{1,12}

Além disso, a temperatura também interfere diretamente na estrutura do biochar. De modo geral, utilizando temperaturas próximas a 400 °C, o material obtido possui estrutura amorfa, altamente desordenada. Com o aumento da temperatura, regiões cristalinas, com folhas de grafeno ligadas entre si turbostraticamente, começam a se formar. Ainda, nessas condições, o material produzido possui uma quantidade considerável de grupos funcionais oxigenados, pois sua carbonização é parcial. Estruturas aromáticas se formam próximo a 800 °C e, conforme a temperatura aumenta, mais espaçamento regularmente ordenado se forma e há diminuição das distâncias interplanares, até que carbono grafitico é gerado, em temperaturas superiores a 2400 °C (Figura 3).^{1,23}

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DAS MUDANÇAS NA ESTRUTURA DO BIOCHAR COM O AUMENTO DA TEMPERATURA DE PIRÓLISE



FONTE: Adaptado de Lehmann.¹

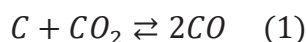
O segundo fator que mais influencia os produtos gerados na pirólise da biomassa é a taxa de aquecimento. Em taxas de aquecimento lentas ($< 10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$), quando as ligações químicas mais fracas quebram, as demais ligações ainda estão estáveis; logo, a estrutura do biopolímero não é tão afetada e as reações de rearranjo são favorecidas de modo a se formar uma matriz sólida mais estável e, assim, inibir a formação de compostos voláteis. Pelo contrário, com taxas de aquecimento muito rápidas ($> 100 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$), como aquelas empregadas na *fast pyrolysis*, vários tipos de ligações químicas são simultaneamente quebrados e compostos voláteis são liberados antes que as reações de rearranjo possam acontecer. Sendo assim, taxas de aquecimento lentas favorecem a produção de biochar, em detrimento da formação de compostos na forma de gases condensáveis e não condensáveis.^{1,12,23,24}

1.1.3 Influência dos Tratamentos de Ativação nas Características Físico-Químicas do Biochar

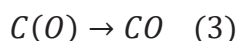
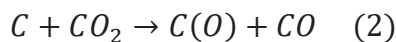
Outro fator que desempenha influência sobre as características do biochar, além da matéria-prima e das condições de pirólise, é o emprego de tratamentos de ativação do material realizados posteriormente à síntese. Estes promovem mudanças na estrutura do biochar, relacionadas a formação de poros e aumento da área superficial e/ou a inserção de mais grupamentos funcionais por meio da oxidação da superfície do carbonáceo, por exemplo.¹

Dentre os métodos que podem ser utilizados para tratamento posterior do biochar, encontra-se a ativação física. Nela, o material é submetido a gaseificação em temperaturas elevadas, geralmente superiores a $700 \text{ }^\circ\text{C}$, na presença de gases oxidantes, como vapor,

ozônio (O₃), ar, dióxido de carbono (CO₂) ou uma mistura deles. Esses agentes oxidantes penetram na estrutura interna do biochar possibilitando o desenvolvimento de poros internos. Além da obtenção de uma maior área superficial, esse tipo de tratamento também fornece um material com um número considerável de grupos funcionais oxigenados. A ativação de biochar (C) com CO₂, por exemplo, envolve o mecanismo descrito pela Reação de Boudouard (1),



cujo processo se dá pela quimissorção dissociativa de CO₂ na superfície carbonácea para formar um óxido superficial (C(O)) e monóxido de carbono (CO), seguido da dessorção do C(O) da superfície, levando ao desenvolvimento da estrutura porosa, conforme representado em 2 e 3.^{1,25,26}



Pode-se, ainda, empregar tratamentos de ativação química do biochar, utilizando agentes que modifiquem a superfície do material, como ácido nítrico (HNO₃),^{27,28} hidróxido de sódio (NaOH),²⁹ peróxido de hidrogênio (H₂O₂),³⁰ ácido sulfúrico (H₂SO₄),³¹ permanganato de potássio (KMnO₄)³² e hidróxido de potássio (KOH).³³ Ao utilizar o agente de ativação básico KOH, por exemplo, ocorre intercalação dos íons potássio entre as lamelas dos cristalitos que compõem a estrutura carbonácea, forçando a separação das mesmas; após a lavagem do material, o cátion é eliminado, deixando, assim, um espaço livre entre as camadas que contribui para o desenvolvimento de porosidade.^{1,34}

A utilização de agentes ácidos para o tratamento do biochar resulta, tipicamente, no aumento do conteúdo de grupos oxigenados na superfície do material. Ao utilizar H₃PO₄ no procedimento, além dos grupos oxigenados, formam-se grupos que contêm fósforo (P). Além disso, este agente atua na dissociação de componentes fracamente ligados a superfície carbonácea, como matéria volátil e carbono lábil, e sua reação com a matriz de carbono gera produtos gasosos que são liberados, de modo que ele também age no sentido de promover aumento da porosidade. A utilização do agente ácido HNO₃, por sua vez, geralmente não resulta no desenvolvimento de poros; porém, este agente também promove a oxidação parcial da estrutura carbonácea, seja das cadeias alifáticas ou dos anéis aromáticos, de modo que o biochar tem aumento do conteúdo de oxigênio e grupos carboxílicos e diminuição da aromaticidade. Nesse caso, ainda, simultaneamente pode ocorrer a nitração do material.³⁵

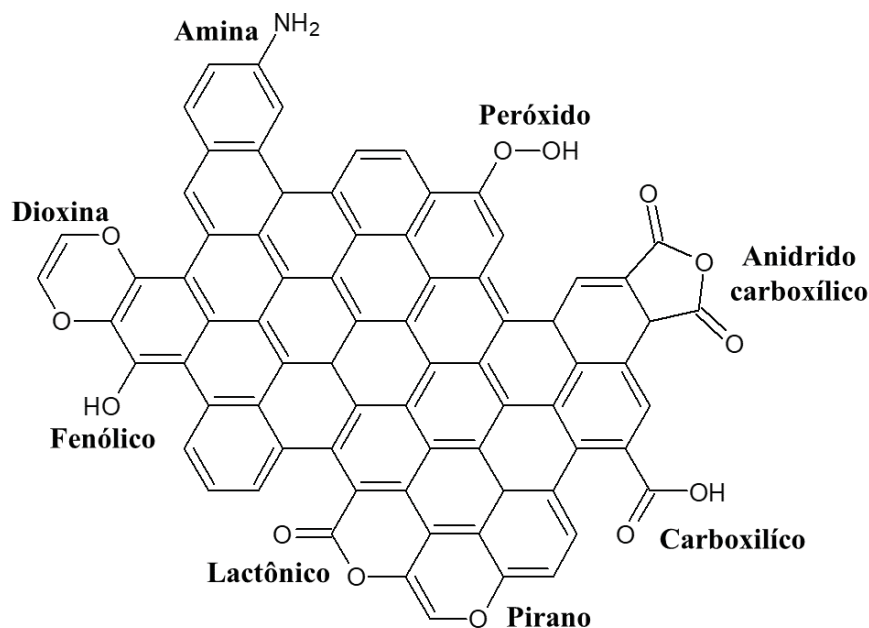
Portanto, os tratamentos de ativação do biochar, físicos ou químicos, vão alterar a estrutura do material e influenciar os mecanismos pelos quais o carbonáceo interage com

espécies de natureza orgânica e inorgânica. Deste modo, assim como a biomassa e as condições de pirólise, o estudo destes tratamentos também é fundamental para se modificar o biochar visando melhorar o desempenho para a finalidade desejada.

1.1.4 Interação do Biochar com Espécies Orgânicas e Inorgânicas

Conforme discutido anteriormente, a modulação das variáveis relacionadas a produção do biochar vai gerar materiais com diferentes características estruturais, dentre as quais a presença de grupos funcionais, principalmente grupos oxigenados. Estes incluem, como pode ser visualizado na Figura 4, grupos carboxílicos, fenólicos, lactônicos, piranos, anidridos carboxílicos, peróxidos e dioxinas, por exemplo, além da presença de heteroátomos. Assim, sítios ácidos e básicos podem coexistir próximos uns dos outros na superfície do biochar.^{1,26,35}

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS E HETEROÁTOMOS COMUMENTE ENCONTRADOS EM BIOCHAR

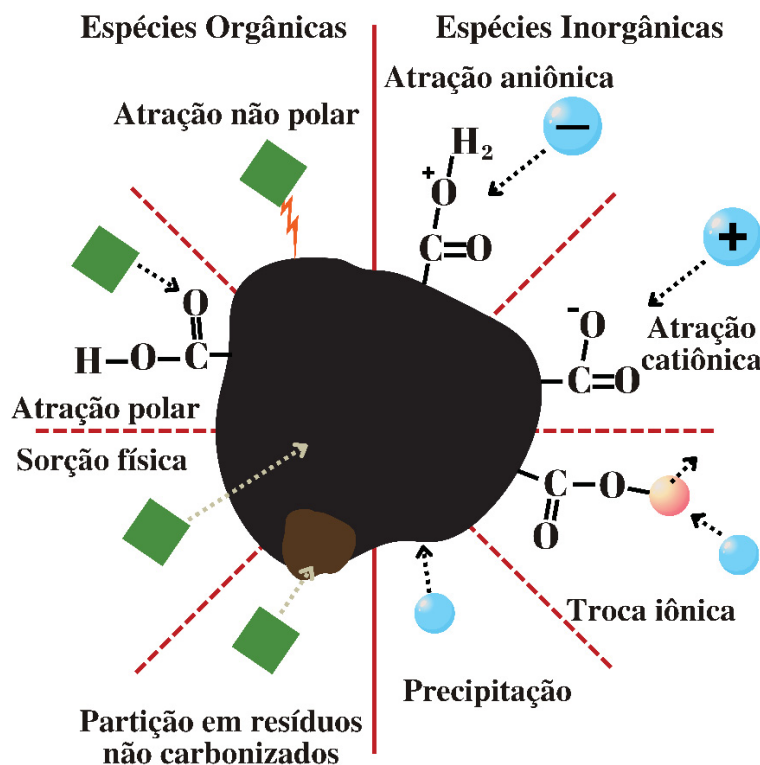


FONTE: Adaptado de Lehmann.¹

A presença desses grupos, por sua vez, influencia os mecanismos de interação do biochar com espécies orgânicas e inorgânicas. Por exemplo, tipicamente, o material produzido em temperatura de pirólise acima de 500 °C possui maior hidrofobicidade, microporosidade e área superficial. Estes fatores facilitam a interação do mesmo com compostos orgânicos, via quimissorção, por interação eletrofílica, e fisissorção, por meio de difusão intrapartícula e atração ou repulsão eletrostática (Figura 5). Já o biochar produzido

em temperaturas de pirólise inferiores a 500 °C possui maior quantidade de grupos funcionais oxigenados e porosidade relativamente baixa, tendo maior afinidade por espécies inorgânicas. Os mecanismos de interação com essas espécies envolvem sorção por troca iônica, interações superficiais via troca iônica, e complexação entre íons metálicos e os grupos funcionais do biochar.²³

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS DE INTERAÇÃO DO BIOCHAR COM ESPÉCIES ORGÂNICAS E INORGÂNICAS



FONTE: Adaptado de Oliveira et al.²³

Esses diferentes mecanismos de interação tem possibilitado aplicações do biochar nas áreas de melhoramento do solo,³⁶ captura de gás carbônico,³⁷ adsorção de metais³⁸ e no desenvolvimento de dispositivos de armazenamento de energia.³⁹ Outra possibilidade é a utilização do biochar na construção de sensores eletroquímicos, aplicados na determinação de espécies diversas.⁴⁰⁻⁴²

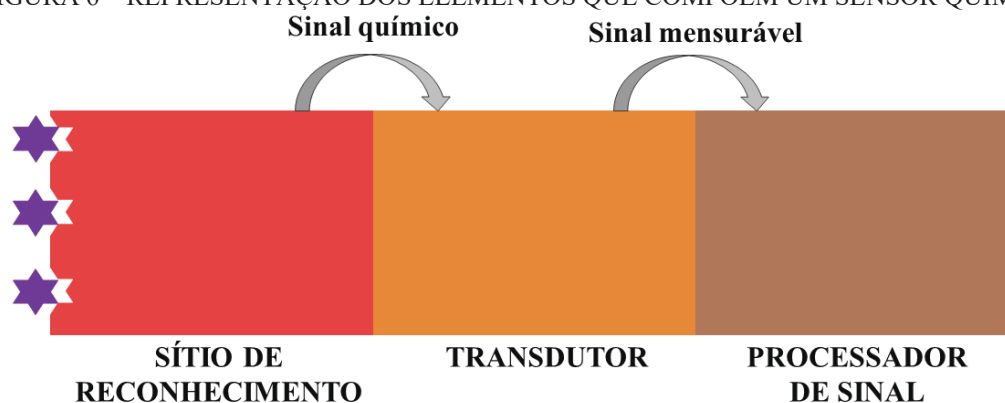
1.2 SENSORES ELETROQUÍMICOS

Diariamente, milhões de testes e medidas são realizados em laboratórios ao redor do globo, seja para controle de qualidade de bens para o comércio, para verificar a qualidade da água, de alimentos e de outros insumos, para fins clínicos de diagnóstico ou para fins

forenses, por exemplo.⁴³ Estas medidas, no geral, são realizadas por meio de técnicas que demandam instrumentos e reagentes de custo elevado, além de um maior tempo de análise.⁴⁴ Assim, faz-se necessário buscar alternativas mais simples, rápidas e baratas, que forneçam resultados acurados, precisos e confiáveis, destacando-se os sensores químicos.

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*),⁴⁵ “um sensor químico é um dispositivo que transforma informação química, variando desde a concentração de um componente específico da amostra até a análise da composição total, em um sinal útil analiticamente.” De modo geral, um sensor é constituído por elementos discretos que podem ser sumarizados em um arranjo (Figura 6) composto por:

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DOS ELEMENTOS QUE COMPÕEM UM SENSOR QUÍMICO



FONTE: A Autora (2022).

- (i) *Sítio de reconhecimento*: responsável por interagir com a espécie de interesse, apresentando alguma alteração resultante desta interação na forma de um sinal químico. Se um biorreceptor – elemento biológico que reconhece especificamente um analito, como, por exemplo, enzimas, células, aptâmeros, ácido desoxirribonucleico e anticorpos - é utilizado no sítio de reconhecimento têm-se os chamados biossensores;
- (ii) *Transdutor*: parte de dispositivo que realiza a transformação do sinal químico em um sinal mensurável, que é analiticamente útil;
- (iii) *Processador de sinal*: responsável pelo armazenamento e exibição dos resultados.^{45,46}

Tipicamente, os sensores químicos são classificados de acordo com o princípio de operação do transdutor, incluindo, por exemplo, os sensores térmicos, ópticos, de massa e os eletroquímicos. Estes últimos são dispositivos que transformam a interação entre o analito e o sítio de reconhecimento em um sinal elétrico (potencial, corrente e carga elétrica, dentre outros) que pode ser mensurado e utilizado para fins analíticos.⁴⁵

O desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos, com destaque para os voltamétricos, tem sido uma das áreas de avanço dentro da Química Analítica e diversos trabalhos de revisão sobre esse tema são encontrados na literatura.⁴⁷⁻⁵¹ Dentre os eletrodos de trabalho mais utilizados como sensores/transdutores voltamétricos, destacam-se materiais como ouro, platina e diversas formas de carbono, além dos eletrodos quimicamente modificados (EQM).

A principal característica dos EQM é a incorporação de espécies diversas a um eletrodo base, visando obter propriedades desejáveis na interface eletrodo/solução. Diversas abordagens podem ser utilizadas para o procedimento de modificação, dependendo da natureza do eletrodo base e do modificador, explorando alguma afinidade entre eles, como a modificação por adsorção, por formação de ligação covalente, pelo recobrimento por filmes poliméricos e a utilização de materiais compósitos. Estas diferentes estratégias, bem como os diferentes materiais que podem ser utilizados como modificadores, podem fazer com que o EQM exiba propriedades vantajosas quanto a exclusão de reações indesejadas, a mediação redox da reação de interesse e a pré-concentração da espécie alvo.⁵² Neste sentido, um material que pode ser utilizado como modificador, na construção de EQM, é o biochar.

1.2.1 Utilização de Biochar na Construção de Eletrodos Quimicamente Modificados

Duas rotas principais são descritas para a modificação de eletrodos com biochar, visando a construção de sensores eletroquímicos:

- (1) Preparo de eletrodos de pasta de carbono modificados (EPCM), por meio da mistura mecânica de biochar, grafite e óleo mineral;
- (2) Modificação de substratos condutivos, como eletrodos de carbono vítreo (GCE, do inglês *glassy carbon electrodes*) ou eletrodos impressos (SPE, do inglês *screen-printed electrodes*), via *drop-casting* de dispersões de biochar.⁴¹

Por meio dessas abordagens e explorando os diferentes mecanismos de interação com espécies orgânicas e inorgânicas inerentes do biochar, têm-se descrito a utilização do material precursor (não submetido a processos de ativação) para a determinação de analitos em matrizes diversas.

Por exemplo, Sughihiro *et al.*⁵³ utilizaram o material produzido a partir de farelo de mamona na construção de EPCM, para determinação de Pb^{2+} e Cd^{2+} em efluente industrial simulado. Os autores investigaram as condições da pirólise e observaram que uma resposta analítica de maior intensidade foi obtida ao se empregar temperatura final de 300 °C, taxa

de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e tempo de residência de 60 min, indicando interação facilitada dos analitos com o material produzido sob essas condições, possivelmente via os grupos oxigenados superficiais do biochar. Utilizando material e processo de construção de eletrodo similar, Oliveira *et al.*⁵⁴ desenvolveram um método para a determinação de íons Cu^{2+} em amostras de bebida alcoólica.

Ademais, Dong *et al.*⁵⁵ mostraram a potencialidade de utilização de biochar como modificador de eletrodo para a determinação da espécie orgânica 17β -estradiol em amostras de água subterrânea. Neste caso, os autores produziram o material a partir de bagaço de cana-de-açúcar, sob a temperatura final de $800\text{ }^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de $7\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e tempo de residência de 60 min e, com ele, prepararam uma dispersão utilizada para modificar um GCE.

Relata-se, ainda, a utilização de biochar ativado na construção dos eletrodos quimicamente modificados. Por exemplo, o material produzido a partir de farelo de mamona, sob as condições de temperatura final de $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, taxa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e tempo de residência de 60 min, e ativado com HNO_3 50 % (v/v), por 3 h a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi utilizado na construção de EPCM. Estes, foram empregados para a determinação de espécies inorgânicas, como Ni^{2+} , em amostras de biocombustível e águas residuais,⁵⁶ e de espécies orgânicas, como o pesticida metil-paration e o antioxidante ácido cafeico, respectivamente, em amostras de água potável e vinho.^{57,58} Sob condições de síntese similar, com exceção da temperatura final de pirólise que foi de $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, Oliveira *et al.*²⁸ utilizaram biochar ativado preparado a partir de borra de café na construção de EPCM, visando a determinação de Pb^{2+} em amostras forenses e de tinta de cabelo. Em todos os casos, os autores compararam a performance analítica dos materiais precursores e ativados e demonstraram interação facilitada do analito com biochar ativado, possivelmente devido à presença de maior quantidade de grupos superficiais oxigenados.

Adicionalmente, as características do biochar em termos de área superficial elevada e estrutura porosa podem ser exploradas na imobilização de diferentes micro- e nanoestruturas metálicas, de modo a se fornecer sítios catalíticos ou de mediação redox adicionais, ou promover a adsorção do analito, por exemplo.⁴¹ Estes materiais podem ser associados ao biochar posteriormente à produção do carbonáceo, explorando estratégias de adsorção espontânea. Nesse sentido, Agustini *et al.*⁵⁹ construíram um EPCM com biochar, realizaram a pré-concentração espontânea de íons Bi^{3+} , visando obter nanoestruturas do metal na superfície eletródica após redução eletroquímica, e utilizaram o dispositivo para a determinação de Pb^{2+} em pratos de cerâmica e porcelana. Uma estratégia semelhante foi

utilizada por Gevaerd *et al.*⁶⁰, por meio da incorporação espontânea de íons Sb^{3+} no eletrodo modificado com biochar, seguido da redução eletroquímica para formar micropartículas que propiciaram maior intensidade da resposta analítica para a determinação do pesticida paraquat em água de torneira e suco de frutas.

Outra abordagem de decoração de biochar descrita na literatura consiste na impregnação da biomassa com uma solução contendo a espécie metálica de interesse, previamente ao processo de pirólise. Deste modo, durante o processo de decomposição térmica da biomassa, concomitantemente ocorre a incorporação do material ao esqueleto de carbono, tal qual reportado por Xiang *et al.*⁶¹ na síntese do compósito biochar/AuNPs. No estudo, os autores impregnaram bambu-da-sorte com solução de ácido cloroáurico (HAuCl_4) para posterior redução do Au^{3+} , juntamente a pirólise da biomassa, levando a formação das nanopartículas ao longo do material. O compósito foi, então, utilizado para modificação de um GCE, via *drop-casting*, e determinação simultânea de catecol e hidroquinona em água de torneira, água de lago e águas residuárias. Baseado também nesta estratégia de obtenção de biochar modificado com outro material, Qu *et al.*⁶² impregnaram casca de tangerina com uma solução contendo íons Fe^{3+} em meio básico e realizaram a pirólise da biomassa de modo a obter um material magnético por meio da incorporação de óxido de ferro ao biochar. Neste caso, também utilizando uma dispersão para modificar um GCE, o dispositivo foi aplicado para determinação de nitrato em solo e em folhas de espinafre.

Por fim, o material de interesse pode ser associado ao biochar pronto para uso, via reações químicas ou eletroquímicas. Neste sentido, Zou *et al.*⁶³ prepararam biochar a partir da fruta da magnólia grandiflora, utilizaram o material para modificar um GCE e, então, realizaram eletrodeposição da estrutura orgânica metálica UiO-66- NH_2 no eletrodo. Com isso, os autores obtiveram respostas voltamétricas com maior intensidade de corrente de pico na determinação de Pb^{2+} e Hg^{2+} em água de lago e água de arroz. Por sua vez, Ates *et al.*⁶⁴ produziram biochar de semente de avelã e submeteram o material a uma reação química com íons Fe^{3+} , para formação do compósito biochar/óxido de ferro, utilizado para modificar um GCE. O material apresentou efeito catalítico sobre a determinação amperométrica de H_2O_2 , sendo realizada a aplicação do método proposto em amostras de leite.

Além da decoração com estruturas metálicas, o biochar pode ser modificado com biomoléculas, devido à presença de grupos carboxílicos na sua superfície que possibilitam esse tipo de imobilização. Ou seja, o biochar pode ser utilizado também para a construção de biossensores. Para tal, Cancelliere *et al.*⁶⁵ produziram biochar a partir de grãos gastos de cervejaria e modificaram SPE com uma dispersão do material. Sobre essa plataforma,

imobilizou-se a enzima tirosinase e o dispositivo foi empregado para determinação amperométrica de epinefrina. Biossensores enzimáticos baseados em GCE modificados com dispersões de biochar ou compósitos metálicos de biochar, com posterior incorporação da enzima tirosinase, também foram propostos, respectivamente, por Liu *et al.*⁶⁶ e He *et al.*⁶⁷ para determinação amperométrica de bisfenol A em amostras aquáticas.

Outra possibilidade relacionada a construção de biossensores em plataformas modificadas com biochar diz respeito à imobilização de antígenos e/ou anticorpos na superfície eletrodica para determinação de seus pares correspondentes. Nesse sentido, Martins *et al.*⁶⁸ utilizaram um eletrodo de pasta de carbono com biocarvão e uma nucleoproteína específica ou anticorpos IgG2b, visando a detecção de Hantavírus em soro por voltametria cíclica. Deste modo, a construção de imunossensores eletroquímicos com base em plataformas modificadas com biochar se apresenta como um nicho a ser explorado.

1.2.2 Imunossensores Eletroquímicos

Quando em contato com um agente patológico, o corpo humano apresenta uma resposta imune à infecção, que depende da atuação integrada da imunidade inata e da imunidade adquirida. Em suma, os mecanismos da resposta imune inata atuam logo após o contato com o agente estranho (antígeno), essencialmente por meio de anticorpos (ou imunoglobulinas, Ig) inespecíficos (IgM).^{69,70}

Os anticorpos IgM são policlonais, ou seja, são uma mistura de imunoglobulinas, sendo cada uma responsável pelo reconhecimento de uma estrutura antigênica diferente, o que faz com que a resposta deles seja inespecífica. Porém, esse mecanismo possibilita a ocorrência da produção de uma resposta lenta, mas específica, denominada imunidade adquirida, constituída por anticorpos específicos IgG. A imunidade adquirida possui, ainda, efeito memorial, de modo que uma resposta mais rápida a reinfecção pelo mesmo agente em períodos posteriores é obtida.^{69,70}

Uma vez que a interação entre antígenos e anticorpos IgG é altamente específica, a utilização dos mesmos para a construção de plataformas de diagnóstico permite a obtenção de dispositivos altamente seletivos, chamados de imunossensores. Esses dispositivos funcionam com base em um tipo de ensaio que envolve a formação de um imunocomplexo antígeno-anticorpo, sendo, por isso, chamado de imunoensaio.⁷¹ Estes ensaios possibilitam, por exemplo, a identificação do agente patogênico que ocasionou determinado quadro

clínico, uma vantagem nas situações em que sintomas de diferentes doenças são similares entre si.⁷²

O método padrão utilizado nos imunoenaios é o ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*), que ocorre, em suma, por meio de reações específicas envolvendo biomoléculas marcadas com enzimas. Esse tipo de ensaio, entretanto, requer um tempo elevado para que as diversas etapas de construção e detecção envolvidas se processem, além de necessitar de pessoal altamente especializado e reagentes de custo elevado. Deste modo, há desvantagens associadas à descentralização desse tipo de ensaio de diagnóstico, que necessita ainda ser realizado em laboratórios clínicos equipados e especializados.⁷³⁻⁷⁵

Por sua vez, os testes baseados em imunocromatografia, como os imunoenaios de fluxo lateral, apresentam-se como uma alternativa ao método ELISA, em termos de tamanho miniaturizado e portabilidade. Todavia, eles geralmente apresentam problemas de sensibilidade e seletividade, devido a interações com os componentes da matriz da amostra, que resultam em respostas falso-negativas ou falso-positivas.⁷³⁻⁷⁵

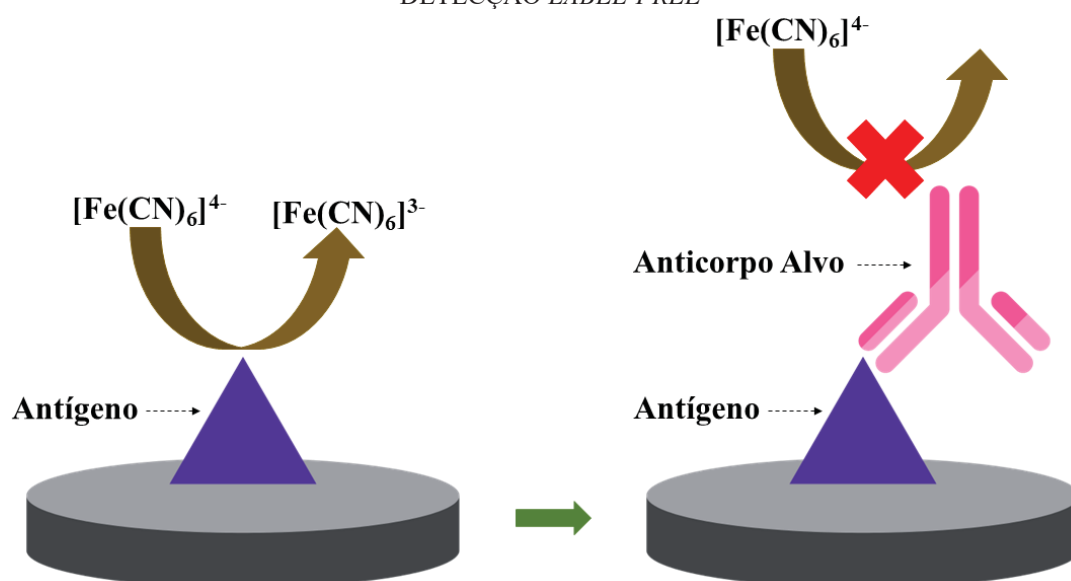
Deste modo, os imunossensores eletroquímicos são uma alternativa para a detecção de antígenos/anticorpos, visando diagnóstico de doenças, visto que são plataformas que combinam a possibilidade de miniaturização e o desenvolvimento de sistemas de detecção custo-efetivos. Assim, esses dispositivos fornecem determinações mais rápidas e baratas, com possibilidade de amplo espalhamento territorial, para serem acessados por toda a população.⁷³⁻⁷⁵

Basicamente, duas abordagens podem ser utilizadas para a detecção dos antígenos e/ou anticorpos:

- (a) *Método indireto*: envolve a utilização de biomarcadores enzimáticos na extremidade do anticorpo; assim, a formação do imunocomplexo é mensurada por meio da detecção do produto da reação enzimática;
- (b) *Método direto* ou *label-free*: detecta-se diretamente a formação do imunocomplexo. Esse método simplifica o processo de construção do dispositivo, pois não é necessária a incorporação da biomolécula marcada na plataforma de detecção. Assim, obtém-se vantagens associadas a menor custo e menor tempo de construção e análise.⁷⁶

Dentre os métodos de detecção possíveis para a configuração *label-free*, encontra-se a detecção eletroquímica por inibição do sinal redox de uma sonda eletroativa, como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$,⁷⁶ cuja representação pode ser visualizada na Figura 7.

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO ENVOLVIDO NO MÉTODO DE DETECÇÃO LABEL-FREE



FONTE: Adaptado de *Martins et al.*⁷⁷

Sendo assim, as alterações no sinal redox da sonda eletroquímica podem ser utilizadas para monitorar as etapas de construção do imunossensor, bem como a formação do imunocomplexo seletivo, sendo esta uma abordagem simples para se construir um dispositivo diagnóstico.⁷⁶

1.3 ANALITOS INVESTIGADOS

As diferentes possibilidades na obtenção do biochar, em termos da matéria-prima, das condições de pirólise, da utilização de etapas de ativação química e da associação com outros materiais, levam a obtenção de produtos com diferentes características. Por consequência, a utilização destes materiais na construção de eletrodos quimicamente modificados propicia a obtenção de interfaces com propriedades diversas, desejáveis para a determinação de espécies de interesse com maior precisão, robustez, seletividade e sensibilidade.^{40,41} Sendo assim, três abordagens de construção de eletrodo utilizando biochar e sua associação com outros materiais foram investigadas neste trabalho, visando a determinação de três analitos distintos:

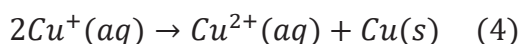
- (1) Pré-concentração espontânea em eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar, seguido de varredura voltamétrica, visando a determinação de íons Cu^{2+} em água de torneira;

- (2) Imobilização de íons Cu^{2+} em eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar, para determinação indireta de creatinina em urina sintética via formação de complexo metálico e supressão do sinal voltamétrico do cobre;
- (3) Modificação de eletrodo impresso de carbono com dispersão de biochar, visando imobilização, via reação de ligação cruzada, do domínio de ligação do receptor da proteína da espícula do SARS-CoV-2, visando obter um imunossensor para detecção de anticorpos contra o vírus em soro.

Mais detalhes acerca dos analitos supracitados são discutidos na sequência.

1.3.1 Íons Cobre (II)

O cobre (Cu) é o metal de transição de número atômico 29, cuja configuração dos elétrons de valência é $3d^{10}4s^1$. Na natureza, além de ser encontrado na sua forma metálica ($\text{Cu}_{(s)}$), pode existir na forma dos cátions Cu^{2+} e Cu^+ . A espécie Cu^+ se forma quando há a perda de um elétron de valência do orbital 4s. Em meio aquoso, entretanto, essa espécie não é estável e pode sofrer desproporcionamento, formando $\text{Cu}_{(s)}$ e Cu^{2+} (4), sendo que o último usualmente existe em água na forma do complexo hexaaquacobre (II), $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, ou seja, está livre em solução.^{78,79}



Nos organismos vivos, o cobre é um elemento essencial encontrado nos seus estados oxidado (Cu^{2+}) e reduzido (Cu^+). Neles, atua como um cofator catalítico na operação de proteínas que desempenham funções relacionadas ao crescimento e ao desenvolvimento. Sendo assim, a deficiência de cobre pode ocasionar danos à saúde humana, como a doença de Menkes, que, por sua vez, pode ocasionar atraso de desenvolvimento, diminuição do tônus muscular, convulsões, neurodegeneração progressiva e anomalias capilares.^{80,81}

Entretanto, quando presente em excesso às necessidades celulares, o cobre pode ser citotóxico, levando a produção em exagero de espécies reativas de oxigênio ou substituindo outros cofatores metálicos de seus ligantes naturais, por exemplo.⁷⁹ Ainda, reporta-se que a ingestão aguda de cobre em excesso na água potável pode causar distúrbios do trato gastrointestinal e a ingestão crônica pode levar a toxicidade hepática em populações sensíveis, tal qual os portadores da doença de Wilson.^{81,82}

De modo geral, o cobre é liberado no ambiente por meio de atividades humanas, como mineração e incineração, acumulando-se principalmente no solo. A liberação em águas ocorre a partir do intemperismo do solo, além da contribuição gerada a partir de descartes

industriais, plantas de tratamento de esgoto e tintas contra incrustação. Uma vez presente em corpos aquáticos, o elemento pode ser conduzido a águas direcionadas ao consumo humano, nas quais, conforme discutido anteriormente, geralmente está livre em solução. A concentração de cobre nessas matrizes pode ser aumentada, ainda, quando encanamentos construídos com o metal são utilizados em sistemas de abastecimento e distribuição de água.⁸³⁻⁸⁵

Devido às questões de toxicidade aguda e crônica anteriormente citadas, fez-se necessário estipular limites máximos de concentração de cobre em água destinada ao consumo humano, como a água de torneira, para evitar efeitos deletérios. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece o limite de 2 mg L^{-1} como concentração máxima de cobre em água potável, para fornecer uma margem de segurança adequada à ingestão desta espécie, considerando a população com homeostase normal de cobre.⁸³ O mesmo limite foi adotado pela legislação vigente no Brasil, dada pela Portaria 888/2021 do Gabinete do Ministro do Ministério da Saúde (GM/MS).⁸⁶

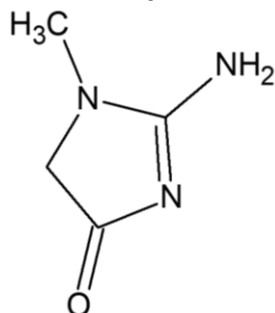
De modo a atender esses requerimentos, diferentes estratégias analíticas vêm sendo descritas e utilizadas para a determinação de cobre em água destinado ao consumo humano. Estas incluem as técnicas de espectrometria de absorção atômica,^{87,88} espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente,^{89,90} espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado^{91,92} e técnicas eletroanalíticas, englobando diferentes tipos de voltametrias.⁹³⁻⁹⁵

Estas últimas, no geral, empregam uma etapa prévia de pré-concentração do analito na superfície eletródica, seja ela espontânea ou aplicando um potencial elétrico. Sendo assim, a utilização de materiais capazes de pré-concentrar os íons Cu^{2+} se mostra relevante, sendo o biochar uma alternativa promissora, visto que a capacidade deste carbonáceo em adsorver o analito já foi demonstrada na literatura.^{54,96,97}

1.3.2 Creatinina

A creatinina (CRE), 2-amino-1-metil-5H-imidazol-4-ona, cuja estrutura química está representada na Figura 8, é o produto final do metabolismo, nos mamíferos, da creatina e da fosfocreatina, que são moléculas relacionadas ao armazenamento de energia nas células musculares.⁹⁸

FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CREATININA



FONTE: Adaptado de Narayanan e Appleton.⁹⁹

Uma vez metabolizada, em indivíduos saudáveis, a creatinina é eliminada primariamente pelos rins, após filtração nos glomérulos e secreção via túbulos proximais. Entretanto, em indivíduos portadores de doenças renais crônicas, há uma diminuição da excreção de creatinina urinária. Por isso, a creatinina vem sendo utilizada no monitoramento da taxa de filtração glomerular renal, que por sua vez, é um indicativo de risco de falha renal.^{98,99} Além disso, a concentração de creatinina urinária tem sido utilizada para detectar adulterações em urina, por meio da diluição das amostras, em verificações de *doping*.¹⁰⁰

O método tradicional de determinação de CRE tem por base a reação de Jaffé, que consiste na formação de um complexo de cor laranja-avermelhada quando a creatinina reage com ácido pícrico em meio alcalino.⁹⁹ Após a obtenção do complexo, de um modo geral, a quantificação do analito é feita pela técnica de espectrofotometria. Entretanto, cromógenos eventualmente presentes na amostra, incluindo ácido ascórbico, glicose, proteínas, pigmentos e algumas drogas, podem interagir com os reagentes, resultando em uma estimativa inexata.^{98,101,102}

As técnicas de eletroforese capilar^{103,104} e cromatografia líquida,¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ por exemplo, também têm sido utilizadas no desenvolvimento de métodos para a determinação de CRE. Esses métodos, entretanto, no geral, requerem etapas de preparo de amostra, resultando no uso de maior volume de reagentes e em maior tempo dispendido no processo.^{102,109-111}

Outra possibilidade explorada para a determinação de creatinina tem por base os métodos enzimáticos, nos quais o analito é convertido enzimaticamente em espécies que podem ser mensuradas por métodos espectrofotométricos e eletroquímicos, por exemplo.¹¹²⁻¹¹⁴ Neste caso, entretanto, ainda que haja ganhos em termos de seletividade, enfrentam-se problemáticas relacionadas a estabilidade da camada enzimática, devido à necessidade, dentre outros, de controle rigoroso de pH e da temperatura para garantir atividade enzimática adequada.^{101,102,109,111}

Sendo assim, métodos eletroquímicos, não-enzimáticos, emergem como uma alternativa para a determinação da espécie de interesse. Neste sentido, a própria reação de Jaffé tem sido explorada para a determinação eletroanalítica de CRE. Randviir *et al.*,¹⁰⁹ por exemplo, submeteram o analito à referida reação e, na sequência monitoraram o sinal voltamétrico da redução do íon picrato em meio básico, utilizando eletrodos impressos de carbono como substrato. Os autores observaram variação na resposta eletroanalítica da espécie sendo monitorada quando diferentes concentrações do analito foram investigadas, demonstrando a possibilidade de um método de determinação indireta de creatinina em amostras de urina.

Além disso, a creatinina forma complexos com diferentes metais de transição e essa propriedade tem sido utilizada para a construção de sensores eletroquímicos. Neste sentido, Silva *et al.*¹¹⁵ eletrodepositaram ouro (Au) em um eletrodo impresso 3D e realizaram a determinação indireta de CRE via supressão do sinal do metal na superfície eletródica. Por sua vez, Fava *et al.*¹¹⁶ deixaram a creatinina em contato com uma solução contendo íons Fe^{3+} e utilizaram um eletrodo impresso por serigrafia modificado com negro de fumo para a redução eletroquímica da espécie metálica não complexada, sendo esta resposta utilizada para a determinação indireta de diferentes concentrações do analito.

Reporta-se, ainda, a utilização de eletrodos modificados com diferentes estruturas de cobre para a determinação de creatinina. Pandey *et al.*,¹¹⁷ por exemplo, utilizaram um eletrodo de fibra de carbono decorado com nanopartículas de cobre, sobre o qual se realizou a deposição eletroquímica de um filme de azul de polimetileno. Esse sistema permitiu a eletrocatalise da reação redox da espécie de interesse e sua determinação direta, com posterior aplicação em amostras de saliva e fluido cérebro espinhal. Por sua vez, Gao *et al.*¹¹⁸ modificaram um eletrodo de carbono vítreo com polidopamina, óxido de grafeno reduzido, azul de Nilo e nanopartículas de cobre e realizaram a determinação indireta de creatinina via supressão do sinal voltamétrico das espécies de cobre, aplicando o dispositivo em amostras de urina.

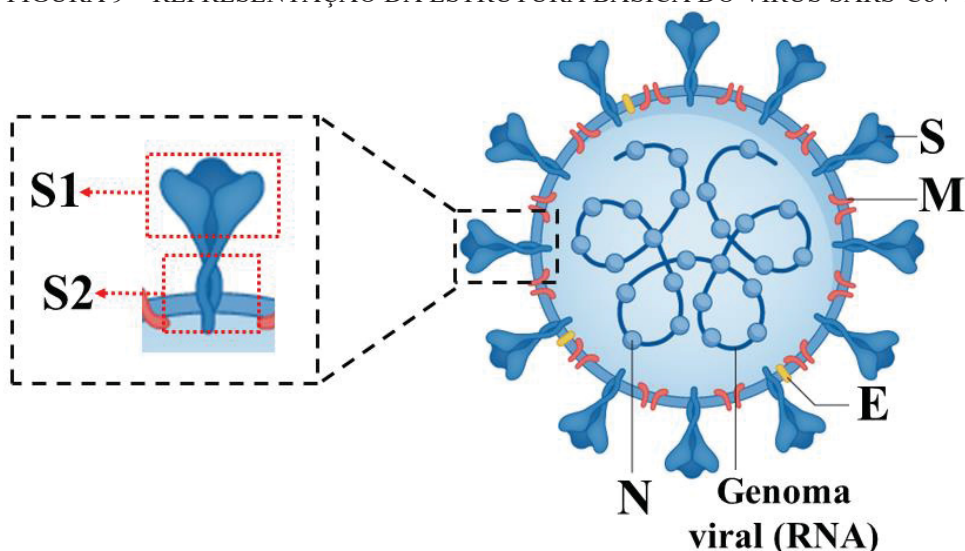
Deste modo, percebe-se a potencialidade de utilizar eletrodos modificados com espécies de cobre para a determinação de creatinina. Sendo assim, a possibilidade de utilizar o eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar para a pré-concentração espontânea de íons Cu^{2+} (imobilização), visando determinação indireta de creatinina via supressão de sinal da espécie metálica, aparece como uma alternativa viável a ser explorada.

1.3.3 Anticorpos Contra o Vírus SARS-CoV-2

Em 31 de dezembro de 2019, a OMS foi alertada de vários casos de pneumonia na cidade de Wuhan, na China. Cerca de uma semana depois, as autoridades chinesas confirmaram que àqueles pacientes haviam sido infectados por uma cepa de coronavírus até então não identificada em seres humanos, sendo o vírus denominado SARS-CoV-2.¹¹⁹ A doença infecciosa causada por esse agente patológico foi chamada de COVID-19 e os pacientes acometidos por ela apresentam como sintomas mais comuns febre, cansaço e tosse seca, além da possibilidade de perda de paladar ou olfato, congestão nasal, conjuntivite, dor de garganta, dor de cabeça, dores nos músculos ou juntas, erupções cutâneas, náusea ou vômito, diarreia, calafrios e tonturas.¹²⁰

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, cujo material genético está contido em uma fita simples de RNA. O vírion é formado por quatro proteínas principais, conforme representado na Figura 9: proteína do nucleocapsídeo (N), proteína transmembrana (M), proteína do envelope (E) e proteína da espícula (S).^{121,122}

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA BÁSICA DO VÍRUS SARS-CoV-2



FONTE: Adaptado de Jackson et al.¹²²

Quanto às funções das estruturas proteicas, a proteína M está relacionada aos mecanismos de produção de novas partículas virais nas membranas celulares, enquanto a proteína E é incorporada ao envelope que envolve o vírus. A proteína N atua nos processos relacionados ao genoma viral, como a replicação do RNA. A proteína S, por sua vez, divide-se nas subunidades S1 e S2; enquanto a subunidade S2 media a fusão das membranas viral e celular, a subunidade S1 está associada com as funções de ligação entre a partícula viral e

a célula hospedeira, que ocorre via os sítios do domínio de ligação do receptor (RBD, do inglês *receptor binding domain*).^{121,122}

Na infecção viral pelo SARS-CoV-2, de um modo geral, os sítios RBD interagem com receptores ACE2 de células hospedeiras e ocorre, então, a entrada das estruturas virais. Uma vez que o vírus adentra no compartimento celular, ocorre replicação do RNA viral, seguido da replicação do próprio vírus, que é, então, liberado para infecção de novas células.¹²¹⁻¹²³ Esse processo faz com que a COVID-19 possua rápido alastramento, devido ao contágio especialmente via secreções e excreções corpóreas. Isso, por sua vez, fez com que, em 30 de janeiro de 2020, a OMS declarasse o surto do SARS-CoV-2 como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional, o mais alto nível de alerta da organização.¹¹⁹

Assim, estabeleceu-se a necessidade de identificar e isolar indivíduos contaminados, de modo a diminuir o alastramento da doença. Com esta finalidade, existem, basicamente, três tipos de testes já disponíveis no mercado, que realizam a identificação de diferentes estruturas virais e podem ser utilizados em diferentes estágios da infecção:

- (1) *Testes genéticos*: baseados no método RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa, do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*), identificam material genético viral;
- (2) *Testes de antígenos*: identificam proteínas virais específicas;
- (3) *Testes sorológicos*: identificam os anticorpos produzidos pelo sistema imunológico em resposta à infecção viral.¹²⁴

Ademais, visando obter testes que sejam cada vez mais seletivos, baratos, de fácil acesso e uso, para que estejam amplamente disponíveis a toda a população, mesmo aqueles afastados de laboratórios clínicos, têm-se desenvolvido dispositivos alternativos, dentre os quais se encontram os imunossensores eletroquímicos.¹²⁵⁻¹²⁷ Neste sentido, o biochar aparece como um material promissor para a construção desse tipo de dispositivo, visto que a presença de grupos oxigenados, como grupos carboxílicos, na sua superfície pode propiciar a imobilização de antígenos e/ou anticorpos.⁶⁸

Esses dispositivos, por sua vez, podem ser empregados para a detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2, especialmente aqueles contra a proteína S, ou componentes de suas subunidades, visto que a avaliação de pacientes acometidos pelo vírus mostrou que anticorpos tem como alvo primário a porção RBD da subunidade S1.^{122,128} Esta medida é crucial para complementar testes de antígeno em estágios mais tardios de infecção, quando a carga viral está reduzida devido a excreção e soroconversão. Adicionalmente, a

vacinação tem sido uma das principais estratégias a nível local e global para conter a pandemia; logo, o monitoramento de anticorpos é uma ferramenta fundamental para avaliar a eficiência dessas vacinas e a imunidade populacional.¹²⁸⁻¹³²

CAPÍTULO 2:
OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir biochar a partir de bagaço de cana-de-açúcar e investigar diferentes abordagens de utilização do material na construção de sensores e biossensores eletroquímicos para a determinação de espécies de interesse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar o biochar produzido a partir de bagaço de cana-de-açúcar empregando diferentes temperaturas finais de pirólise e um procedimento de ativação química ácido;
- Utilizar os materiais produzidos na construção de eletrodos de pasta de carbono modificados, aplicados para a pré-concentração espontânea e determinação voltamétrica de íons Cu^{2+} , visando o desenvolvimento de um método para a determinação do analito em água de torneira;
- Utilizar o eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar contendo Cu^{2+} imobilizados para o desenvolvimento de um método de determinação indireta de creatinina, via formação de complexo com o íon metálico, em urina sintética;
- Utilizar dispersões de biochar para a modificação de eletrodos impressos de carbono, a serem usados como plataforma para a imobilização da proteína RBD do SARS-CoV-2, visando obter um imunossensor eletroquímico para detecção de anticorpos contra o vírus em amostras de soro fortificadas.

CAPÍTULO 3:
MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados durante o desenvolvimento deste estudo, bem como as respectivas fórmulas químicas, pureza e procedência, são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - REAGENTES UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

Reagente	Fórmula Química/Abreviação	Pureza	Procedência
Acetato de amônio	CH ₃ COONH ₄	≥ 98 %	Ecibra
Acetato de níquel tetra hidratado	C ₄ H ₆ NiO ₄ .4H ₂ O	≥ 99 %	Riedel-de Haën
Acetato de sódio	CH ₃ COONa	≥ 98 %	Êxodo Científica
Acetato de zinco di hidratado	(CH ₃ COO) ₂ Zn.2H ₂ O	≥ 98 %	Vetec
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	99,8 %	Neon
Ácido clorídrico	HCl	36,5 %	J.T. Baker
Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico di hidratado	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ . 2H ₂ O	≥ 98,5 %	Synth
Ácido nítrico	HNO ₃	65 %	Cinética
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	95 – 97 %	Merck
Ácido úrico	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
Brometo de potássio	KBr	99,9 %	Merck
Cloreto de cálcio anidro	CaCl ₂	≥ 96 %	Vetec
Cloreto de estanho di hidratado	SnCl ₂ .2H ₂ O	98,0 – 103,0 %	Vetec
Cloreto de manganês	MnCl ₂	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Cloreto de potássio	KCl	99 – 100,5 %	Êxodo Científica
Cloreto de sódio	NaCl	≥ 99 %	Merck
Cloreto férrico hexa hidratado	FeCl ₃ .6H ₂ O	≥ 97 %	Synth
Creatinina	C ₄ H ₇ N ₃ O	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Ferricianeto de potássio	K ₃ [Fe(CN) ₆]	99,95 %	Merck
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
Glicose anidra	C ₆ H ₁₂ O ₆	P.A.	Reagen
Grafite	C _n	---	Fischer Chemical
Hidrocloreto de N-(3- dimetilaminopropil)-N'- etilcarbodiimida	EDC	≥ 97,0 %	Merck
Hidrogenocarbonato de sódio	NaHCO ₃	99,7 – 100,3 %	Vetec
Hidrogenofosfato dissódico	Na ₂ HPO ₄	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
Hidróxido de amônio	NH ₄ OH	28 – 30 %	Vetec
Hidróxido de potássio	KOH	≥ 85 %	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	NaOH	≥ 97 %	Neon
Nitrato de bário	Ba(NO ₃) ₂	≥ 99 %	Merck
Óleo mineral	---	---	Merck
Padrão de cobre	Cu ²⁺	1000 mg L ⁻¹	Merck
Padrão de selênio	Se	1000 mg L ⁻¹	Dinâmica
Sal sódico de N- hidroxisulfosuccinimida	NHS	98 %	Merck
Tris(hidroximetil)aminometano	Tris	99 %	Invitrogen
Ureia	NH ₂ CONH ₂	99,0 – 100,5 %	Sigma-Aldrich

Fonte: A autora (2022)

Mais especificamente, no estudo referente ao desenvolvimento do imunossensor eletroquímico, a albumina de soro bovino (BSA), o domínio de ligação do receptor (RBD, do inglês *receptor-binding domain*) da proteína da espícula (S, do inglês *spike*) do SARS-

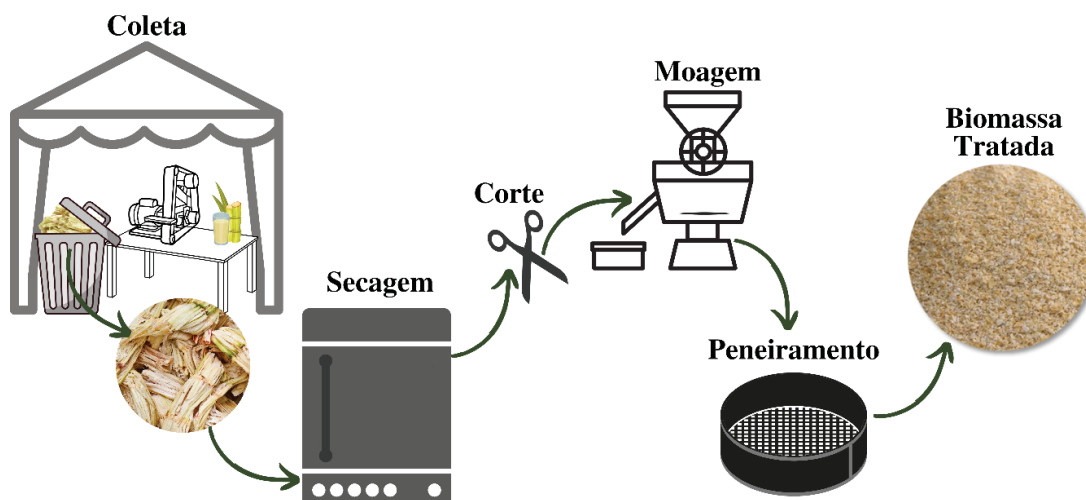
CoV-2 ($0,12 \text{ mg mL}^{-1}$) e anticorpos IgG contra a proteína S do SARS-CoV-2 (15 mg mL^{-1}) foram fornecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular, do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), foi preparado a partir de NaCl, KCl, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 . Além do uso para o preparo da solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, o tampão PBS também foi utilizado para preparar as soluções de BSA e do analito (anticorpos) nas concentrações requeridas e para diluição da amostra. O tampão tris salino (pH 9,0) foi preparado a partir do tampão tris ultrapuro em pó adquirido da Invitrogen e de NaCl e utilizado para preparar as soluções da proteína RBD nas concentrações requeridas.

As demais soluções, bem como os referidos tampões, foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q, Millipore), com resistividade superior a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

3.2 OBTENÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido no comércio de rua de Curitiba – Paraná, Brasil. O pré-tratamento da biomassa, esquematizado na Figura 10, teve início com a secagem da matéria-prima em estufa a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h, imediatamente após a coleta, visando remoção da umidade para evitar a proliferação de microorganismos. Na sequência, realizou-se o corte do bagaço, de modo a obter material de tamanho adequado para inserção no moinho. A moagem foi realizada em um moinho de facas tipo Willey (STAR FT 50, Fortinox). Então, as amostras pulverizadas foram peneiradas para obtenção de partículas com granulometria inferior a 80 mesh. Todas as etapas de pré-tratamento foram realizadas no Laboratório de Processos e Projetos Ambientais (LABPPAM), da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DE PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

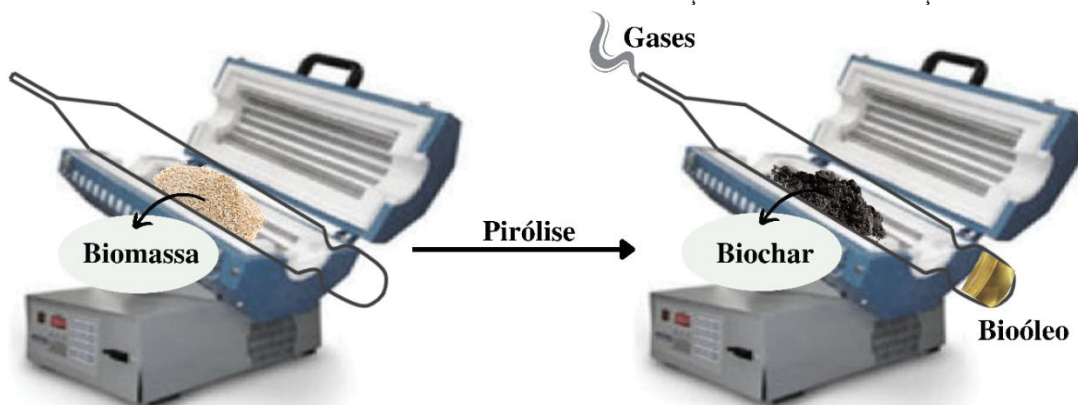


Fonte: A autora (2022).

3.3 PRODUÇÃO DO BIOCHAR

O biochar foi produzido a partir do processo de pirólise do bagaço de cana-de-açúcar, tendo como base trabalhos anteriores do grupo de pesquisa.^{28,96} Para tal, 10 g de biomassa foram acomodados em um suporte interno do forno EDG FT-40, composto por um tubo de vidro, adaptado para que ocorra saída de compostos voláteis por uma das extremidades, sendo vedado na face oposta (Figura 11). As condições experimentais fixadas foram tempo de residência de 60 min e taxa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com variação da temperatura final da pirólise nos valores de 300, 400, 500, 600 e 700 $^{\circ}\text{C}$. Desta forma, obteve-se o biochar precursor, sendo os materiais denominados como: BC300, BC400, BC500, BC600 e BC700. Esta etapa também foi realizada no LABPPAM/UFPR.

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO APARATO UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DO BIOCHAR A PARTIR DA PIRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

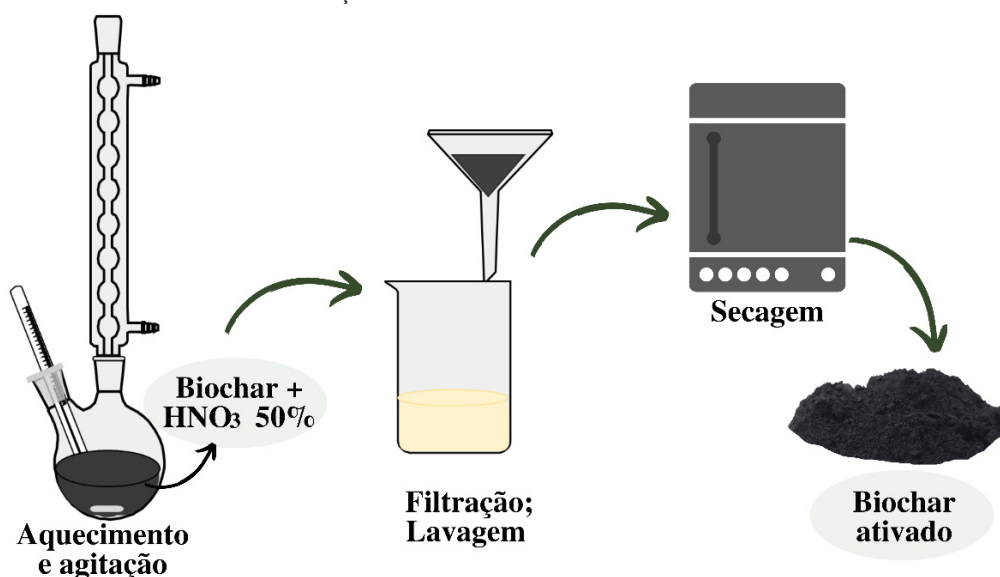


Fonte: A autora (2022).

3.4 ATIVAÇÃO DO BIOCHAR

Após a pirólise, o biochar produzido sob as diferentes temperaturas foi submetido a um processo de tratamento superficial por ativação química, visando a incorporação de grupos oxigenados superficiais (Figura 12). Para tal, 50 mL de solução de HNO_3 50 % (v/v) foram adicionados a um balão de fundo redondo contendo 1,0 g de biochar precursor. As dispersões foram colocadas em um sistema acoplado a um condensador para evitar escape de gases, sob agitação constante, e mantidas na temperatura de 60 °C por 3 horas, seguindo as condições previamente otimizadas por Kalinke *et al.*⁹⁷ Na sequência, as misturas foram filtradas e o precipitado foi lavado com água destilada até que a solução do sobrenadante apresentasse caráter neutro. Depois, o sólido foi seco em estufa a 100 °C por 24 h, sendo obtidos os biocarvões biochar ativado, nomeadas como: BCA300, BCA400, BCA500, BCA600 e BCA700. Para fins de comparação, grafite foi submetido ao procedimento de tratamento superficial descrito.

FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO EMPREGADO PARA A OBTENÇÃO DO BIOCHAR ATIVADO



Fonte: A autora (2022).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCHAR E BIOCHAR ATIVADO

3.5.1 Termogravimetria

Análises termogravimétricas foram realizadas para avaliar as perdas de massa do bagaço de cana-de-açúcar (biomassa) e dos diferentes materiais preparados a partir dessa

matéria-prima (biochar e biochar ativado). Para isso, utilizou-se um analisador térmico Shimadzu, Modelo TGA-50, em atmosfera inerte de nitrogênio, empregando taxa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e temperatura final de $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$. As análises foram realizadas no Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM) da Universidade Federal do Sergipe (UFS).

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para verificar a morfologia da biomassa pré-tratada e do biochar produzido sob as diferentes condições de síntese. Para tal, uma fita de cobre foi colada no centro de um *stub* (porta-amostra) e o sólido a ser analisado foi colocado sobre ela com o auxílio de uma espátula. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 LMU. Para estimar a composição elementar qualitativa das amostras, realizaram-se análises de espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Os espectros foram obtidos com um sistema de análise química, marca Oxford, acoplado ao microscópio eletrônico de varredura. Ambas as análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR.

3.5.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier

Para a caracterização dos materiais por espectroscopia na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), inicialmente, realizou-se o preparo das pastilhas de análise. Para isso, uma alíquota de cada material foi homogeneizada com KBr e a mistura foi prensada com uma prensa hidráulica. A adequabilidade de cada pastilha foi verificada pela observação da ausência de particulados e de distribuição homogênea dos materiais sob análise. As medidas foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química da UFPR, utilizando um espectrômetro de infravermelho, modelo Vertex 70 da Bruker, na região de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ e os espectros foram coletados após 16 *scans*.

3.5.4 Estimativa de Grupos Ácidos Superficiais

A estimativa de grupos ácidos superficiais dos materiais foi realizada com base no método de Boehm.¹³³ Para tal, empregou-se um procedimento que consistia nas seguintes etapas:

- (1) 50 mg de cada material foram dispersos em 5,0 mL de solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹, previamente padronizada, mantendo-se a mistura sob agitação constante por 24 h;
- (2) A mistura foi filtrada e, ao filtrado, adicionou-se 10 mL de solução de HCl 0,10 mol L⁻¹, previamente padronizada;
- (3) Realizou-se titulação potenciométrica, empregando solução previamente padronizada de NaOH 0,10 mol L⁻¹ como titulante.

A titulação potenciométrica foi realizada utilizando um eletrodo combinado de vidro acoplado em um pHmetro Metrohm, modelo 780.

3.5.5 Espectroscopia Raman

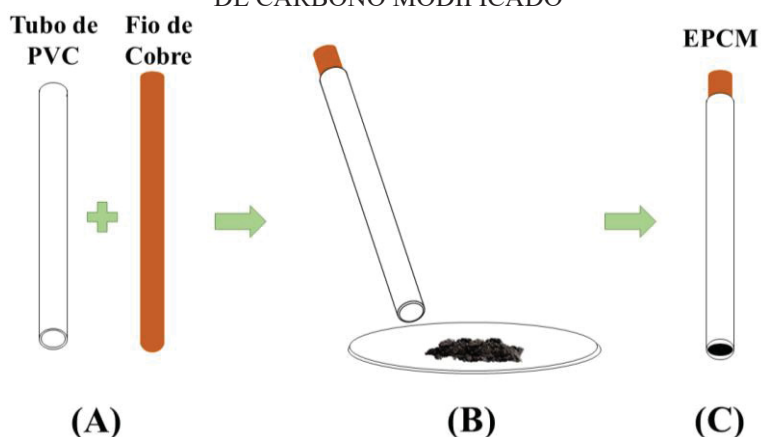
Os espectros Raman foram obtidos utilizando um microscópio Witec Alpha 300R, empregando um laser de 532 nm, com potência de 5,55 mW, e amostragem de quatro (04) pontos por material. Essas análises foram realizadas no CME/UFPR.

3.6 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÍONS COBRE (II) UTILIZANDO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR

3.6.1 Construção dos Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados

Para o preparo dos eletrodos de pasta de carbono modificados (EPCM), nas investigações iniciais, realizou-se a homogeneização dos componentes nas seguintes proporções: 10 % (m/m) de biochar, 65 % (m/m) de grafite e 25 % (m/m) de óleo mineral. A mistura homogeneizada foi, então, compactada em um suporte de PVC com diâmetro interno de 3,0 mm, com o auxílio de uma haste de cobre que também foi utilizada como contato elétrico. Eletrodos de pasta de carbono não modificados também foram preparados, para fins comparativos, utilizando uma proporção de 25 % (m/m) de óleo mineral e 75 % (m/m) de grafite. Este procedimento está representado esquematicamente na Figura 13.

FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONSTRUÇÃO DO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO



FONTE: A autora (2022)

LEGENDA: (A) Tubo de PVC e fio de cobre;

(B) Processo de compactação da pasta de carbono modificada no tubo de PVC contendo o fio de cobre;

(C) Eletrodo de pasta de carbono modificado pronto para uso.

3.6.2 Medidas Voltamétricas para a Determinação de Cu^{2+}

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato-galvanostato ($\mu\text{Autolab}$ Tipo III), gerenciado pelo software NOVA 2.1. Para tal, utilizou-se uma célula eletroquímica equipada com um sistema convencional de três eletrodos: (i) eletrodo de trabalho: eletrodo de pasta de carbono ou eletrodo de pasta de carbono modificado; (ii) eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$); e (iii) contraeletrodo: placa de platina. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, por meio do uso de três eletrodos ($n = 3$).

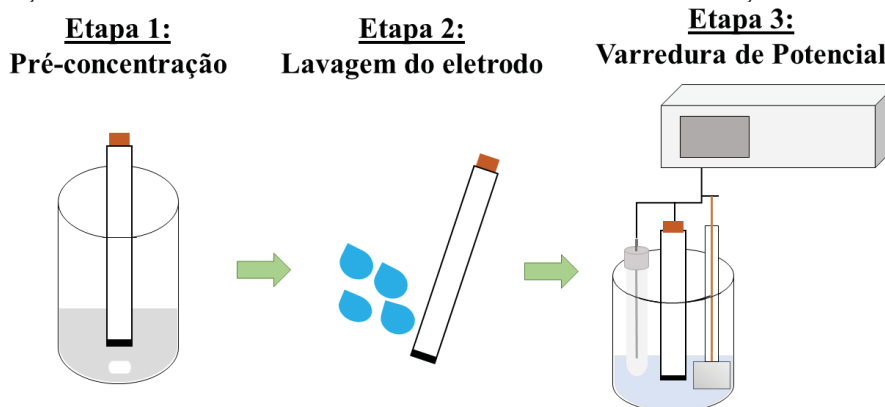
O procedimento adotado para determinação de íons Cu^{2+} era composto de três etapas: pré-concentração, lavagem do eletrodo e varredura de potencial, conforme esquematizado na Figura 14. Considerando em um primeiro momento condições não otimizadas, as etapas foram executadas conforme descrito a seguir.

- (1) *Etapa de pré-concentração*: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu^{2+} , em solução de acetato de amônio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,0), foram espontaneamente pré-concentrados nos eletrodos construídos utilizando os diferentes materiais produzidos, por 5 min sob agitação constante;
- (2) *Etapa de lavagem do eletrodo*: o eletrodo foi retirado da solução de pré-concentração e cuidadosamente lavado com água ultrapura, para remoção de íons eventualmente não adsorvidos;

(3) *Etapa de varredura de potencial*: após a lavagem, o eletrodo de trabalho foi transferido para a cela eletroquímica, que continha como eletrólito suporte 10,0 mL de uma solução de acetato de sódio 0,10 mol L⁻¹ (pH 5,0), e submetido à etapa de determinação voltamétrica. Isto posto, empregou-se como técnicas:

- Voltametria cíclica (CV, do inglês *cyclic voltammetry*), para avaliar a potencialidade dos diferentes materiais produzidos na pré-concentração e posterior determinação do analito. Para tal, realizou-se varredura na faixa de potencial de -0,5 V a 0,5 V, com velocidade de varredura (v) de 100 mV s⁻¹ e degrau de potencial (*step*) de 7,44 mV;
- Voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *differential pulse voltammetry*), para desenvolvimento do método eletroanalítico, utilizando o material que forneceu a resposta melhor definida na CV. Neste caso, inicialmente, aplicou-se um potencial de pré-condicionamento de -0,3 V durante 60 s, visando promover a redução da espécie de interesse previamente incorporada no eletrodo. Na sequência, a oxidação do analito foi monitorada na faixa de potencial de -0,3 V a +0,3 V, empregando amplitude de pulso (a) de 100 mV, tempo de pulso (t_p) de 200 ms e $v = 10$ mV s⁻¹.

FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO ADOTADO PARA REALIZAÇÃO DAS MEDIDAS VOLTAMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE(II)



Fonte: A autora (2022)

Estudos complementares foram realizados para verificar o comportamento eletroquímico do analito (Cu²⁺) frente ao eletrodo de trabalho modificado com o material que forneceu a resposta melhor definida e a viabilidade do método de determinação proposto. Neste sentido, medidas de CV foram realizadas empregando eletrólito suporte submetido a desaeração com N₂ durante 300 s, para verificar o perfil voltamétrico na ausência de O₂.

Adicionalmente, outras técnicas voltamétricas foram investigadas para o desenvolvimento do método de determinação da espécie de interesse. Sendo assim, após a etapa de condicionamento, além do emprego da DPV sob as condições previamente descritas, investigou-se a determinação por (i) voltametria de varredura linear (LSV, do inglês *linear sweep voltammetry*), utilizando $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e $step = 7,44 \text{ mV}$; e (ii) voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *square-wave voltammetry*), utilizando $step = 5,0 \text{ mV}$, $a = 20 \text{ mV}$ e frequência (f) de 25 Hz. Para a técnica voltamétrica que forneceu a resposta mais adequada em termos de corrente e potencial de pico, investigou-se também o efeito da varredura direta, isto é, na ausência do condicionamento prévio. Para isso, utilizaram-se os mesmos parâmetros instrumentais e a mesma faixa de potencial, porém, a varredura foi realizada no sentido catódico.

Na sequência, verificou-se o efeito de memória e a efetividade de diferentes procedimentos de limpeza da superfície eletródica. Para tal, o eletrodo era submetido às etapas de pré-concentração, limpeza e varredura de potencial. Então, trocava-se a solução de eletrólito suporte contida na cela eletroquímica, o eletrodo era novamente colocado neste compartimento e o procedimento de condicionamento e varredura de potencial realizados. Entre as diferentes varreduras, observou-se a resposta obtida quando o eletrodo era submetido à três condições:

- (a) Nenhum tipo de limpeza/renovação superficial era realizado;
- (b) A superfície do eletrodo era renovada via polimento mecânico em folha de papel sulfite;
- (c) O eletrodo era submetido à limpeza química, em solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, durante 5 min sob agitação constante.

Por fim, verificou-se a variação do sinal voltamétrico para a determinação de Cu^{2+} utilizando o procedimento proposto. Para isso, investigou-se a resposta obtida ao se empregar um mesmo eletrodo, submetido ao procedimento de limpeza superficial mais adequado, e diferentes eletrodos ($n = 5$).

3.6.3 Avaliação da Composição da Pasta de Carbono Modificada

Para avaliar a composição de modificador na pasta de carbono, visando obtenção de maior intensidade de corrente de pico (I_{pa}), eletrodos com diferentes proporções de biochar foram construídos. Nos estudos, a massa de óleo mineral foi fixada em 25% e

proporções de biochar de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35% (m/m) foram investigadas. Todas as medidas foram realizadas em triplicata ($n = 3$).

3.6.4 Avaliação das Soluções de Pré-Concentração e Leitura

A influência de duas soluções, em diferentes valores de pH, no processo de pré-concentração espontânea do analito na superfície eletródica foi avaliada. Os meios estudados foram acetato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado com ácido acético glacial em 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 e acetato de amônio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado com hidróxido de amônio P.A. nos valores de 8,0, 9,0 e 10,0. Fixaram-se os demais parâmetros relacionados a essa etapa do procedimento: $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu^{2+} e tempo de pré-concentração de 5 min.

A solução de acetato de amônio foi empregada neste estudo de modo a explorar a complexação que ocorre entre íons cobre (II) e amônia, possibilitando, assim, a investigação em meios alcalinos, sem que ocorra precipitação do analito.⁵⁴ De modo a entender melhor a interação entre complexo metálico e superfície eletródica, um estudo empregando EDTA como complexante foi realizado. Para isso, uma solução de EDTA $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) e, a ela, adicionou-se o analito na concentração de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. O pH desta solução foi ajustado com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} para 9,0 e realizou-se o procedimento de pré-concentração seguido da determinação voltamétrica.

No caso da solução de leitura, utilizada na etapa de redissolução, também foram avaliados dois meios em diferentes valores de pH: acetato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado com ácido acético glacial em 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 e acetato de amônio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado com hidróxido de amônio P.A. nos valores de 8,0 e 9,0. Adicionalmente, para o meio que forneceu resposta mais intensa em termos de I_{pa} , investigou-se a influência do tempo de contato entre o eletrodo contendo os íons cobre previamente incorporados e a solução de leitura, nas seguintes condições: 0 min (a medida era iniciada imediatamente após o eletrodo ser acomodado na cela eletroquímica), 1, 3, 5 e 10 min de contato entre eletrodo e solução de leitura.

Após a definição das soluções de pré-concentração e leitura, avaliou-se o tempo de pré-concentração que forneceria a resposta mais adequada na determinação de duas concentrações de cobre: $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. No primeiro caso, investigaram-se os tempos de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 60 min, enquanto no segundo caso os tempos de 5, 10, 15, 20 e 30 min foram estudados.

Em todos estes estudos, as medidas foram realizadas em triplicata ($n = 3$).

3.6.5 Avaliação do Potencial e do Tempo de Condicionamento

Para promover a redução eletroquímica do analito, investigaram-se diferentes valores do potencial de condicionamento, nos valores de 0,0; -0,1; -0,2; -0,3; -0,4 e -0,5 V. Na sequência, o tempo de realização dessa etapa foi analisado, estudando-se os valores de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 s. Todas as medidas foram realizadas em triplicata ($n = 3$).

3.6.6 Estudo dos Parâmetros Instrumentais da Voltametria de Pulso Diferencial

A amplitude e o tempo do pulso da técnica de voltametria de pulso diferencial foram avaliados. Para tal, os valores de amplitude de pulso de 20, 40, 60, 80 e 100 mV foram investigados, bem como os tempos de pulso de 50, 75, 100, 150 e 200 ms. Todas as medidas foram realizadas em triplicata ($n = 3$).

3.6.7 Estimativa dos Parâmetros de Validação para a Determinação de Cu^{2+} em Água de Torneira

Uma vez otimizados os parâmetros de pré-concentração e determinação de íons Cu^{2+} , investigou-se a resposta do procedimento proposto para diferentes concentrações do analito. Para isto, inicialmente, quantidades de Cu^{2+} variando de 1,0 a 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram pré-concentradas em eletrólito puro (solução de pré-concentração), seguido da determinação voltamétrica. Os valores de corrente de pico (I_{pa}) obtidos foram, então, correlacionados com suas respectivas concentrações. Medidas em triplicata foram realizadas para cada nível investigado e, para isso, reitera-se que três eletrodos foram construídos e individualmente submetidos ao procedimento.

Após a delimitação visual da possível faixa linear da curva de calibração construída em eletrólito puro, os mesmos níveis de concentração do analito foram investigados na construção de uma curva de calibração na presença de uma amostra de água de torneira, de modo a se avaliar o efeito da matriz. Esta amostra havia sido previamente coletada no Departamento de Química da UFPR, em uma torneira cuja água era destinada para o consumo humano, e armazenada sob a temperatura de 4 °C, em um recipiente plástico devidamente higienizado, até sua utilização.

Visto que a concentração máxima limite de cobre em amostras de água para consumo humano, segundo a Portaria 888/2021 do Gabinete do Ministro do Ministério da

Saúde (GM/MS),⁸⁶ é de 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (31,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), optou-se por realizar a diluição da amostra na solução de pré-concentração em uma proporção 1:4 (v/v) (amostra:solução de acetato de amônio 0,1 mol L^{-1} , pH = 9), de modo que esta concentração alvo ficasse localizada no nível médio da curva previamente obtida no eletrólito puro. Portanto, para a determinação de Cu^{2+} na matriz, realizaram-se as devidas fortificações da amostra, que foi diluída na solução de acetato de amônio na proporção anteriormente descrita, obtendo-se os níveis de concentração requeridos, sendo realizada a pré-concentração nas condições previamente otimizadas, seguida da determinação voltamétrica. Então, a inclinação da curva de calibração obtida na presença da matriz foi comparada com a inclinação da curva de calibração obtida em eletrólito puro, utilizando um teste-*t*, no nível de confiança de 95 %, para verificar se haveria diferenças significativas entre os coeficientes angulares, isto é, se o efeito de matriz era significativo.¹³⁴

Na sequência, a homogeneidade das variâncias foi verificada por meio do teste de Cochran, no nível de confiança de 95%, e a regressão linear foi realizada utilizando o método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta. A adequação dos dados ao modelo linear foi avaliada na faixa estabelecida para o método pela verificação dos valores do coeficiente de correlação (*r*) e do coeficiente de determinação (R^2). Além disso, testes-*F* foram utilizados para avaliar a significância da regressão e da falta de ajuste, também para o nível de confiança de 95%. Por fim, realizou-se a análise do gráfico de resíduos.^{43,134}

Para a estimativa do limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ), utilizou-se o método simplificado a partir da curva analítica, por meio do qual os parâmetros podem ser obtidos, respectivamente, a partir das Equações 1 e 2, nas quais *b* = coeficiente angular da curva analítica e *s* = desvio padrão do primeiro ponto utilizado na construção da curva analítica.¹³⁴

$$LOD = \frac{3,3s}{b} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LOQ = \frac{10s}{b} \quad (\text{Equação 2})$$

Então, a influência de espécies catiônicas que podem ser encontradas em água de torneira sobre a resposta da espécie de interesse foi investigada, visto que nas condições adotadas as mesmas também podem interagir com os grupos funcionais do biochar. Para isso, a concentração de cobre foi fixada em 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (7,87 $\mu\text{mol L}^{-1}$), a qual corresponde à diluição 1:4 do limite máximo estabelecido na Portaria GM/MS 888/2021 e os interferentes foram adicionados na solução de pré-concentração também considerando a sua concentração, pós diluição, caso estivessem presentes nas amostras na concentração máxima

estipulada pela legislação: $175 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ba^{2+} ($700 \mu\text{g L}^{-1}$), $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe^{3+} ($300 \mu\text{g L}^{-1}$), $1250 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn^{2+} ($5000 \mu\text{g L}^{-1}$) e $50000 \mu\text{g L}^{-1}$ de Na^+ ($200000 \mu\text{g L}^{-1}$).⁸⁶

A estimativa da precisão foi realizada em termos da repetitividade e da precisão intermediária. Para tal, realizaram-se três determinações em três dias distintos para três concentrações de cobre: $1,09 \mu\text{mol L}^{-1}$ (LOQ), $7,87 \mu\text{mol L}^{-1}$ (concentração máxima permitida pela legislação, após a diluição) e $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (limite superior da faixa de trabalho adotada). Uma análise de variância (ANOVA) de um fator foi aplicada aos dados obtidos, para cada concentração, em um nível de confiança de 95%. A partir dela, os desvios padrão da repetitividade (s_r) e da precisão intermediária (s_{pi}) foram calculados, de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente,

$$s_r = \sqrt{MQ_{dentro}} \quad (\text{Equação 3})$$

$$s_{pi} = \sqrt{s_r^2 + \left(\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n} \right)} \quad (\text{Equação 4})$$

nas quais MQ_{dentro} corresponde à média quadrática dentro do grupo, MQ_{entre} corresponde à média quadrática entre grupos e n corresponde ao número de réplicas. Em seguida, os desvios padrão relativos (RSD%) foram calculados, segundo a Equação 5, na qual s corresponde ao desvio padrão da repetitividade ou da precisão intermediária e \bar{x} corresponde a média global obtida para cada nível de concentração.⁴³

$$RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (\text{Equação 5})$$

Por fim, realizou-se a determinação dos íons Cu^{2+} na amostra de água de torneira, cuja coleta foi anteriormente descrita. Para tal, a mesma foi fortificada com duas concentrações do analito ($4,36 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $31,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), de modo que após a diluição com a solução de pré-concentração correspondessem às concentrações de $1,09 \mu\text{mol L}^{-1}$ (LOQ) e $7,87 \mu\text{mol L}^{-1}$ (concentração máxima permitida pela legislação, após a diluição). A determinação foi realizada por adição de padrão, em triplicata para cada nível avaliado, sendo o analito adicionado nas concentrações de 2,0; 4,0 e $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados encontrados também foram utilizados para estimar a exatidão, expressa em termos de recuperação, de acordo com a Equação 6, na qual C_1 = concentração do analito na amostra fortificada, C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.^{43,134}

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

3.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CREATININA UTILIZANDO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR E ÍONS COBRE (II)

3.7.1 Instrumentação

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato-galvanostato (μ Autolab Tipo III), gerenciado pelo software NOVA 2.1. Para tal, utilizou-se uma célula eletroquímica equipada com um sistema convencional de três eletrodos: (i) eletrodo de trabalho: eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar; (ii) eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹); e (iii) contraeletrodo: placa de platina. Todas as medidas foram realizadas em triplicata (n = 3).

3.7.2 Procedimento de Determinação de Creatinina via Supressão do Sinal Voltamétrico dos Íons Cu²⁺

Para o desenvolvimento do procedimento de determinação indireta de creatinina via supressão do sinal voltamétrico dos íons Cu²⁺, condições otimizadas para o íon metálico foram adotadas. Assim, o eletrodo de pasta de carbono foi modificado com 10% de biochar (BCA400) e empregado nas etapas de pré-concentração de Cu²⁺ e creatinina e na etapa de varredura voltamétrica.

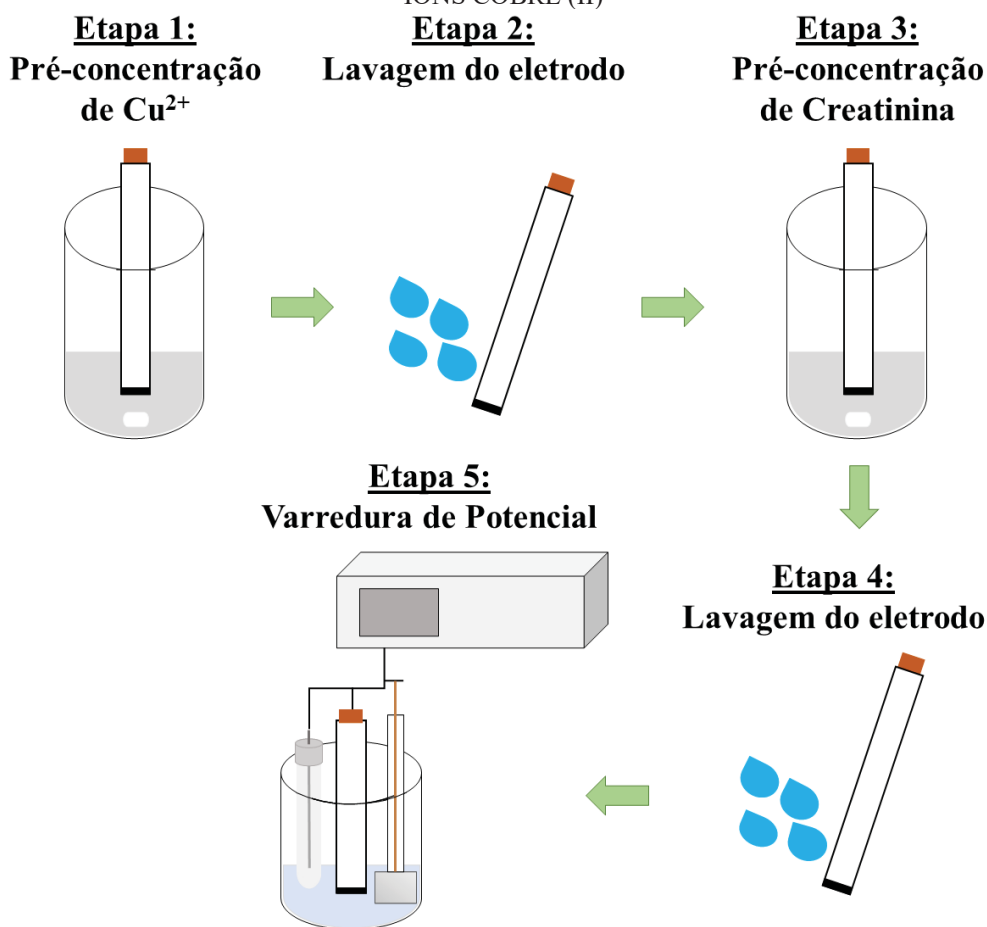
O procedimento (Figura 15) consistia, de modo geral, nas seguintes etapas:

- (1) *Pré-concentração de Cu²⁺*: a concentração requerida de Cu²⁺, em solução de acetato de amônio 0,10 mol L⁻¹ (pH 9,0), foi espontaneamente pré-concentrada nos eletrodos modificados com biochar, por 5 min sob agitação constante;
- (2) *Lavagem do eletrodo*: o eletrodo foi retirado da solução de pré-concentração de Cu²⁺ e cuidadosamente lavado com água ultrapura, para remoção de íons eventualmente não adsorvidos;
- (3) *Pré-concentração de Creatinina*: a concentração requerida de creatinina (CRE), em solução de KCl 0,10 mol L⁻¹, foi espontaneamente pré-concentrada no eletrodo contendo os íons Cu²⁺ imobilizados, por 10 min sob agitação constante;
- (4) *Lavagem do eletrodo*: o eletrodo foi retirado da solução de pré-concentração de CRE e cuidadosamente lavado com água ultrapura, para remoção de espécies que eventualmente não estivessem interagindo com os íons imobilizados no eletrodo;

(5) *Varredura de potencial*: o eletrodo de trabalho foi transferido para a cela eletroquímica, que continha como eletrólito suporte 10,0 mL de uma solução de acetato de sódio 0,10 mol L⁻¹ (pH 5,0), e submetido à etapa de determinação voltamétrica, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV). Para a determinação, duas abordagens foram investigadas:

- Varredura direta no sentido catódico: a varredura foi realizada na faixa de potencial de +0,4 a -0,4 V, empregando amplitude de pulso (a) de 100 mV, tempo de pulso (t_p) de 200 ms e velocidade de varredura (v) = 10 mV s⁻¹;
- Pré-condicionamento seguido de varredura no sentido anódico: inicialmente, aplicou-se um potencial de pré-condicionamento de -0,3 V durante 60 s, seguido da varredura de potencial na faixa de -0,3 V a +0,3 V, empregando a = 100 mV, t_p = 200 ms e v = 10 mV s⁻¹.

FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO ADOTADO PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE CREATININA VIA SUPRESSÃO DO SINAL VOLTAMÉTRICO DE ÍONS COBRE (II)



Fonte: A autora (2022).

3.7.3 Avaliação do pH da Solução de Pré-Concentração de Creatinina

A influência do pH da solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ sob a extensão da interação da CRE com os íons Cu²⁺ previamente imobilizados no eletrodo foi avaliada. Para isso, investigou-se a solução em seu pH original (5,5) e após ajustes para os valores de 3,0 e 8,0, utilizando, respectivamente, HCl 1,0 mol L⁻¹ e KOH 1,0 mol L⁻¹. Todas as medidas foram realizadas em triplicata (n = 3) e as concentrações de Cu²⁺ e CRE empregadas foram, respectivamente, 0,5 mmol L⁻¹ e 1,0 mmol L⁻¹.

3.7.4 Avaliação do Tempo de Pré-Concentração de Creatinina

Avaliou-se o tempo de pré-concentração que forneceria a supressão da resposta de 0,5 mmol L⁻¹ de Cu²⁺ mais adequada, visando a determinação indireta de 1,0 mmol L⁻¹ de CRE. Para tal, investigaram-se os tempos de 3, 5, 10, 15 e 30 min. Todas as medidas foram realizadas em triplicata (n = 3).

3.7.5 Avaliação da Concentração de Íons Cu²⁺ Imobilizados no Eletrodo de Trabalho

Investigou-se como a concentração de íons Cu²⁺ previamente imobilizada no eletrodo de trabalho interferiria na determinação de diferentes concentrações de CRE. Para isso, duas condições foram avaliadas: (i) pré-concentração de 0,5 mmol L⁻¹ de Cu²⁺, seguido da interação com concentrações de CRE variando de 1,0 a 5,0 mmol L⁻¹; e (ii) pré-concentração de 0,1 mmol L⁻¹ de Cu²⁺ seguido da interação com concentrações de CRE variando de 0,2 a 1,0 mmol L⁻¹. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.7.6 Estimativa dos Parâmetros de Validação para a Determinação de Creatinina em Urina Sintética

Uma vez otimizados os parâmetros referentes a etapa de interação da creatinina com o eletrodo contendo os íons cobre (II) imobilizados, estimaram-se os parâmetros de validação para a determinação do analito em urina sintética. A amostra foi previamente preparada em água ultrapura, utilizando os seguintes componentes: 7,60x10⁻³ mol L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O, 0,0500 mol L⁻¹ de NaCl, 0,0158 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, 0,0103 mol L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,0215 mol L⁻¹ de KCl, 0,0187 mol L⁻¹ de NH₄Cl e 0,416 mol L⁻¹ de ureia. O pH da solução foi ajustado para pH = 7,4 com NaOH 0,1 mol L⁻¹.¹³⁵

A concentração alvo de CRE foi definida como $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, tendo por base o estudo realizado por Arndt,¹⁰⁰ no qual se analisaram 45.000 amostras de urina, determinando-se concentrações médias do analito entre $6,39 - 8,14 \text{ mmol L}^{-1}$ para mulheres e $8,61 - 12,3 \text{ mmol L}^{-1}$ para homens. Optou-se por realizar a pré-concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de Cu^{2+} no eletrodo de trabalho e empregar diluição de 1:20 (v/v) (amostra de urina:solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), para o estudo do efeito de matriz, de modo que a concentração alvo após a diluição ficasse na região média da curva de correlação anteriormente obtida, na ausência da matriz. Portanto, para a determinação de CRE na matriz, realizaram-se as devidas fortificações da amostra, que foi diluída na solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na proporção anteriormente descrita, obtendo-se os níveis de concentração requeridos. Então, o eletrodo contendo os íons Cu^{2+} previamente imobilizados foi colocado na solução contendo a matriz e o analito e, após o tempo de interação, fez-se a determinação voltamétrica. A inclinação da curva de calibração obtida na presença da matriz foi comparada com a inclinação da curva de calibração obtida em eletrólito puro, utilizando um teste-*t*, no nível de confiança de 95 %, para verificar se haveria diferenças significativas entre os coeficientes angulares, isto é, se o efeito de matriz era significativo.¹³⁴

Na sequência, a homogeneidade das variâncias foi verificada por meio do teste de Cochran, no nível de confiança de 95%, e a regressão linear foi realizada utilizando o método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta. A adequação dos dados ao modelo linear foi avaliada na faixa estabelecida para o método pela verificação dos valores do coeficiente de correlação (*r*) e do coeficiente de determinação (R^2). Além disso, testes-*F* foram utilizados para avaliar a significância da regressão e da falta de ajuste, também para o nível de confiança de 95%. Por fim, realizou-se a análise do gráfico de resíduos.^{43,134}

Para a estimativa do limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ), utilizou-se o método simplificado a partir da curva analítica, por meio do qual os parâmetros podem ser obtidos, respectivamente, a partir das Equações 1 e 2.¹³⁴

Então, a influência de espécies que podem ser encontradas em urina sobre a resposta da espécie de interesse foi investigada. Para isso, a concentração de creatinina foi fixada em $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, a qual corresponde à diluição 1:20 da concentração alvo, e os interferentes foram adicionados na solução que continha o analito, nas seguintes concentrações: $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido úrico, $1,11 \text{ nmol L}^{-1}$ de Ni, $6,40 \text{ nmol L}^{-1}$ de Se, $1,18 \text{ nmol L}^{-1}$ de Sn e $0,546 \text{ nmol L}^{-1}$ de Ba. Estas espécies iônicas foram selecionadas visto que são comumente aquelas presentes em maior concentração em urina,¹³⁶ e as concentrações investigadas já consideram a diluição 1:20 (v/v) (amostra de urina:solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

A estimativa da precisão foi realizada em termos da repetitividade e da precisão intermediária. Para tal, realizaram-se três determinações em três dias distintos para três concentrações de cobre: $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ (LOQ), $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (concentração alvo, após a diluição) e $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ (limite superior da faixa de trabalho adotada). Uma análise de variância (ANOVA) de um fator foi aplicada aos dados obtidos, para cada concentração, em um nível de confiança de 95%. A partir dela, os desvios padrão da repetitividade (s_r) e da precisão intermediária (s_{pi}) foram calculados, de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente. Em seguida, os desvios padrão relativos (RSD%) foram calculados, segundo a Equação 5.⁴³

Por fim, realizou-se a determinação de creatinina na amostra de urina sintética. Para tal, a mesma foi fortificada com duas concentrações do analito ($6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$), de modo que após a diluição com a solução de pré-concentração correspondessem às concentrações de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (concentração alvo, após a diluição). A determinação foi realizada por adição de padrão, em triplicata para cada nível avaliado, sendo o analito adicionado nas concentrações de $0,1$ e $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. Os resultados encontrados também foram utilizados para estimar a exatidão, expressa em termos de recuperação, de acordo com a Equação 6.^{43,134}

3.8 DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS SARS-COV-2 UTILIZANDO ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR

3.8.1 Medidas Voltamétricas

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato Metrohm AUTOLAB PGSTAT128N operado pelo software NOVA 2.1. A voltametria cíclica (CV, do inglês *cyclic voltammetry*) e a voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *differential pulse voltammetry*) foram realizadas utilizando $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (2 mmol L^{-1}) como sonda redox e tampão PBS ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) como eletrólito suporte. Na voltametria cíclica, empregou-se a faixa de potencial de $-0,3$ a $0,6 \text{ V}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . O procedimento de DPV consistiu em aplicar um potencial de pré-condicionamento de $-0,4 \text{ V}$ por 10 s , seguido de varredura de potencial de $-0,4$ a $0,5 \text{ V}$, com amplitude de pulso de 150 mV , tempo de pulso de 500 ms e velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} .

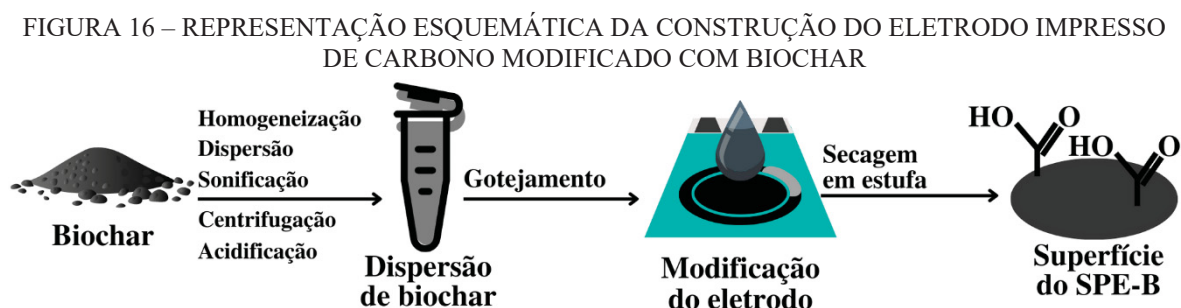
3.8.2 Modificação do Eletrodo Impresso de Carbono com a Suspensão de Biochar

Para a investigação da potencialidade do biochar em atuar na imobilização de biomoléculas, os diferentes materiais produzidos (BC300, BC400, BC500, BC600, BC700, BCA400, BCA500, BCA600 e BCA700) foram investigados como modificadores de eletrodos de carbono impressos (SPE, do inglês *screen-printed carbon electrodes*). Para isso, preparou-se uma dispersão com cada material, de acordo com o seguinte procedimento:

- (1) O material foi homogeneizado por 15 min com almofariz e pistilo e disperso em água ultrapura na proporção de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$;
- (2) A dispersão foi submetida a sonificação em banho ultrassônico por 30 min;
- (3) A dispersão foi centrifugada (centrífuga Quimis 222-TI8) por 5 min a 1500 rpm;
- (4) O sobrenadante foi coletado e acidificado com solução de HCl 1 mol L^{-1} para se obter uma concentração de 0,1% de ácido na dispersão final, visto que se reporta maior homogeneidade na distribuição de biochar sobre superfícies de carbono ao se realizar esse procedimento.⁵⁵

Antes de cada uso, a dispersão era sonificada em banho ultrassônico por 20 min.

SPE comerciais (Methrom Dropsens) formados por eletrodo de trabalho e contra eletrodo de carbono e pseudoreferência de Ag foram utilizados como plataforma para a construção do imunossensor. Para o processo de modificação, $5,0 \mu\text{L}$ da dispersão de biochar eram gotejados sobre o eletrodo de trabalho, tomando cuidado para que não ocorresse espalhamento sobre as demais partes do SPE, e realizava-se secagem em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ até evaporação total do solvente, que demandava cerca de 20 min. Desse modo, obtiveram-se os eletrodos de carbono impressos modificados com biochar (SPE-B), conforme representado esquematicamente na Figura 16.

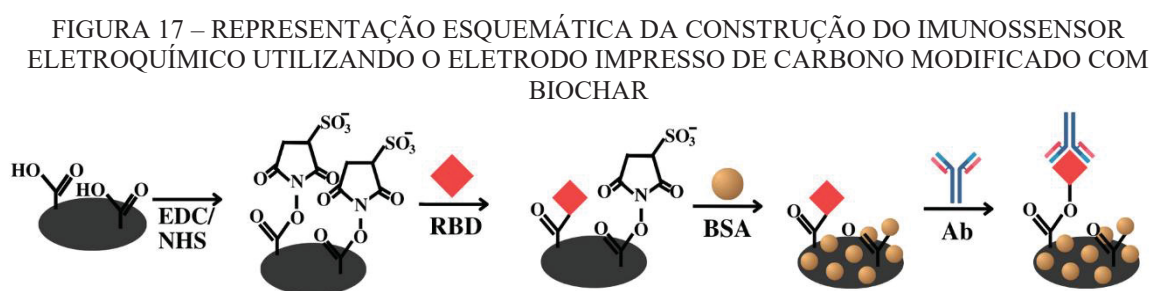


FONTE: A Autora (2022).

O material BCA300 não pode ser investigado porque a massa obtida após o procedimento de homogeneização foi insuficiente para o preparo de um volume de dispersão que possibilitasse o procedimento de modificação de eletrodo proposto.

3.8.3 Construção do Imunossensor Eletroquímico

Para a construção do imunossensor eletroquímico e avaliação da potencialidade dos diferentes materiais na imobilização de biomoléculas, nos estudos iniciais, utilizou-se o conhecimento prévio do grupo para definir concentrações, tempos e temperaturas de incubação dos diferentes componentes do imunossensor.^{68,137,138} Na Figura 17, apresenta-se uma representação esquemática do procedimento adotado.



FONTE: A Autora (2022).

Isto posto, o SPE-B foi submetido a reação de ligação cruzada com EDC/NHS, que ativa os grupos carboxílicos do biochar para a reação de amidação com biomoléculas. Para isso, 5,0 μL de uma solução contendo 6,4 mmol L^{-1} de EDC e 8,7 mmol L^{-1} de NHS foram gotejados diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho e incubados a 37 °C por 60 min sob uma atmosfera úmida. Para criar essa atmosfera, um pedaço de papel absorvente era colocado dentro de uma placa de Petri e umedecido com água ultrapura; sobre esse papel, era colocado o SPE, tomando cuidado para que os contatos elétricos não fossem expostos diretamente à água, e, então, outra placa de Petri era posicionada sobre o compartimento, de modo a evitar perda de água por evaporação para o ambiente externo. Na sequência, realizava-se a incubação da proteína RBD do SARS-CoV-2, por meio do gotejamento de 5,0 μL de uma solução contendo esse reagente sobre o eletrodo de trabalho e incubação a 4 °C por 60 min. Seguia-se com o ancoramento do BSA, usando 5,0 μL de uma solução 1,0 mg mL^{-1} e incubando a 4 °C por 15 min.

Depois da construção do imunossensor, o mesmo foi utilizada para detecção de anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2 (Ab, do inglês *antibodies*). Para isso, 5,0 μL de uma

solução contendo $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anticorpo eram gotejados sob a superfície do eletrodo de trabalho e incubados a 4°C durante 60 min.

Entre as diferentes etapas de construção e detecção do dispositivo, a região do eletrodo de trabalho do SPE-B era cuidadosamente imersa em um béquer contendo água ultrapura, e retirada após cerca de 2 s, de modo a remover espécies não especificamente imobilizadas.

Ademais, cada etapa de imobilização e a etapa de detecção foram monitoradas por meio do comportamento eletroquímico da sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, observado por meio de CV. Sendo assim, a resposta dos dispositivos construídos utilizando os diferentes materiais foi avaliada em termos de perfil voltamétrico para cada etapa de construção e detecção, bem como em termos da supressão de sinal obtida na etapa de detecção em relação ao sinal da etapa anterior (imobilização de BSA).

Depois de estabelecer o material que forneceu a resposta mais adequada para a detecção do analito, otimizaram-se alguns parâmetros relativos à construção do imunossensor. Novamente, utilizou-se conhecimento prévio do grupo para definir quais variáveis seriam investigadas.^{68,137,138} Sendo assim, avaliou-se:

- Tempo de incubação de EDC/NHS: 15, 30, 45 e 60 min;
- Tempo de incubação de RBD: 15, 30, 45 e 60 min;
- Temperatura de incubação de RBD: 4°C e 37°C (sob atmosfera úmida);
- Concentração de RBD: $0,012 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,024 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- Tempo de incubação de Ab: 15, 30, 45 e 60 min;
- Temperatura de incubação de Ab: 4°C e 37°C .

3.8.4 Estimativa dos Parâmetros Analíticos para a Detecção de Anticorpos Contra o Vírus SARS-CoV-2 em Amostra de Soro Comercial

Para a determinação de anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2 em amostras de soro comercial, inicialmente, verificou-se a possibilidade de utilizar a técnica de DPV, de modo a conseguir resultados mais sensíveis se comparado a CV. Para tal, investigou-se as respostas obtidas para a sonda, por meio de DPV, após cada etapa de construção e para a determinação do analito, na ausência da matriz.

Na sequência, investigou-se se haveria efeito de matriz e se as condições empregadas para a construção do imunossensor permitiram a diferenciação de amostras de

soro negativas e positivas à presença do analito. Para isso, uma diluição 1:1000 (v/v) (soro:PBS) foi realizada, para evidenciar qualquer interferência advinda da matriz. A resposta, a partir daqui, foi obtida em termos de supressão do sinal, utilizando a Equação 7, pois observou-se variabilidade da resposta voltamétrica obtida para os eletrodos base, sem modificação, utilizados para a construção dos imunossensores, especialmente se SPEs de diferentes lotes eram utilizados.

$$\%I_p = \frac{I_p(Ab)}{I_p(BSA)} \times 100\% \quad (\text{Equação 7})$$

Uma vez verificado a ocorrência desse efeito, modificações na etapa de imobilização do BSA na superfície eletródica foram realizadas. Assim sendo, aumentou-se o volume gotejado para 7,5 μL , para propiciar uma cobertura mais efetiva do eletrodo de trabalho pela gota, e realizou-se incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$, para favorecer a cinética da reação.

Na sequência, a matriz foi diluída na proporção 1:10000 (v/v) (soro:PBS) e fortificada com concentrações de anticorpo variando de 0,010 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as repostas foram avaliadas e comparadas com a resposta de um controle (soro negativo). A partir da média obtida para o soro negativo, calculou-se o valor de corte, como sendo o limite inferior do intervalo da resposta negativa, no nível de confiança de 95 %, utilizando para tal a Equação 8,

$$\bar{x} \pm \frac{t_{(n-1)}s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 8})$$

na qual \bar{x} é a média da resposta do soro negativo; $t_{(n-1)}$ é o valor t da distribuição de Student, s é o desvio-padrão da resposta do soro negativo e n é o número de medidas.

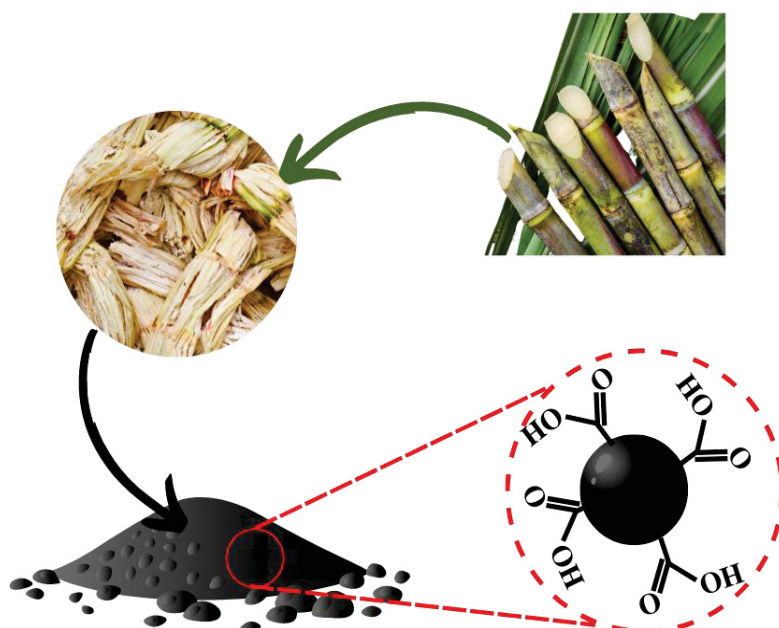
A seletividade foi avaliada contra amostras de soro fortificadas com o analito (Ab-RBD, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o anticorpo contra a febre amarela (Ab-FA, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e uma mistura de ambos.

Para verificar a estabilidade, o imunossensor foi construído e armazenado a 4 $^{\circ}\text{C}$, sob uma atmosfera úmida, com uma gota de PBS (0,01 mol L^{-1}) cobrindo o eletrodo de trabalho, até uso. A performance do dispositivo foi avaliada após 1, 3, 7 e 14 dias de construção.

Todas as medidas, para cada condição e/ou concentração investigadas, foram realizadas em triplicata ($n = 3$).

CAPÍTULO 4:
RESULTADOS E DISCUSSÃO

SEÇÃO 4.1:
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCHAR DE
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR



4.1.1 Rendimento da Produção de Biochar

Na produção do biochar a partir do bagaço de cana-de-açúcar variou-se a temperatura final de pirólise, visto que o material pode adquirir diferentes características morfológicas e estruturais em razão desse parâmetro, o que pode influenciar a interação do material com espécies de origem orgânica e inorgânica.²³ O rendimento percentual (m/m), para cada uma das temperaturas investigadas, é apresentado na Tabela 2.

TABELA 2 - RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOCHAR EM DIFERENTES TEMPERATURAS FINAIS DE PIRÓLISE

T_{pirólise} (°C)	Rendimento (%)
300	44
400	29
500	26
600	25
700	23

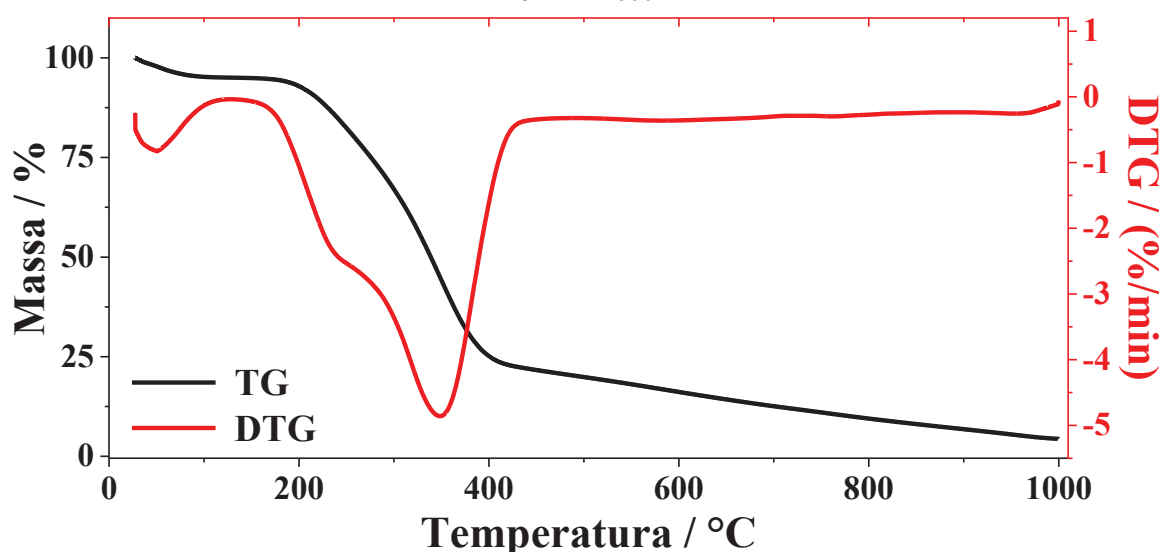
FONTE: A Autora (2021)

Observa-se que o percentual de material obtido foi diminuindo ao se utilizar temperaturas finais de pirólise mais elevadas, o que pode estar relacionado a maior degradação do bagaço de cana-de-açúcar. Na pirólise da biomassa, utilizando taxas de aquecimento lentas, a decomposição térmica da lignocelulose tem início em cerca de 120 °C, sendo dominada pela formação de biochar e gases até temperaturas finais de pirólise abaixo de 300 °C. Esse processo é iniciado por radicais livres, que levam a clivagem homolítica das ligações, formando grupos carbonila e carboxila que, subsequentemente, formam os gases monóxido e dióxido de carbono. Ademais, reações de desidratação resultam na liberação de água da estrutura original. Quando as temperaturas finais de pirólise ficam entre 300 e 600 °C, os caminhos reacionais relativos à formação de bioóleo e alcatrão começam a ganhar importância e, conseqüentemente, a produção de biochar é reduzida. Já nas temperaturas finais superiores a 600 °C, o caminho de formação de gases é o dominante, reduzindo ainda mais a formação de biochar. Desta forma, quanto mais elevada a temperatura final de pirólise, menor o rendimento esperado em termos de biochar.^{1,12}

4.1.2 Termogravimetria

Inicialmente, a técnica de termogravimetria foi utilizada para se obter informações sobre o comportamento térmico da biomassa (bagaço de cana-de-açúcar), com base na variação das massas (TG). Na Figura 18, apresenta-se as curvas referentes ao percentual em massa (TG) e à derivada do percentual em massa em relação ao tempo (DTG) obtidas para o bagaço de cana-de-açúcar.

FIGURA 18 - CURVAS DE TG E DTG PARA O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, OBTIDAS EM ATMOSFERA DE N₂ SOB TAXA DE AQUECIMENTO DE 5 °C min⁻¹, NA FAIXA DE TEMPERATURA DE 25 °C A 1000 °C

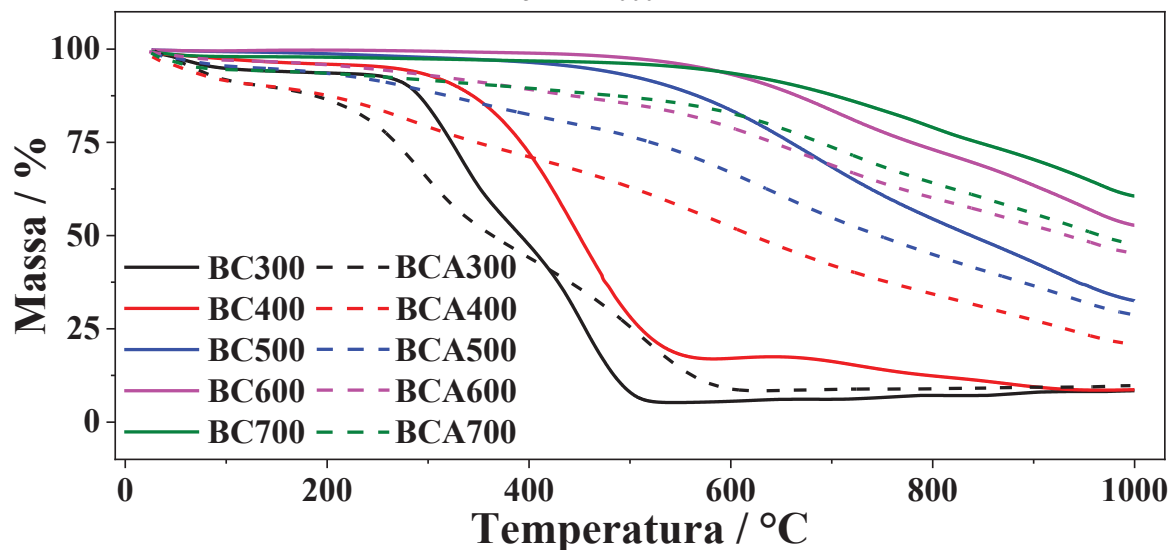


Fonte: A autora (2022).

Nas curvas termogravimétricas da Figura 18, observa-se a ocorrência de três processos de perda de massa acentuada. O primeiro processo (27,6 – 100 °C) se refere à perda de água e materiais orgânicos voláteis adsorvidos na superfície da biomassa. O processo seguinte (170 – 290 °C) tem relação com a degradação completa da hemicelulose e decomposição parcial da celulose e da lignina. O terceiro processo (290 – 430 °C) se associa à degradação total da celulose e decomposição parcial da lignina. Por fim, a perda de massa lenta e estável que ocorre nas temperaturas superiores a 430 °C pode ser associada à degradação da lignina e consequente aumento do grau de carbonização.^{1,139,140}

De modo semelhante, análises termogravimétricas foram realizadas para o biochar produzido sob as diferentes temperaturas de pirólise, bem como para os materiais ativados, e as curvas obtidas podem ser visualizadas na Figura 19.

FIGURA 19 - CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS PARA O BIOCHAR, PRODUZIDO SOB AS DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE, E PARA O BIOCHAR ATIVADO, OBTIDAS EM ATMOSFERA DE N₂ SOB TAXA DE AQUECIMENTO DE 5 °C min⁻¹, NA FAIXA DE TEMPERATURA DE 25 °C A 1000 °C



Fonte: A autora (2022).

Considerando os materiais precursores (não ativados), verifica-se que BC300 apresentou três processos de perda de massa acentuada, tal qual a biomassa, que podem ser associados também à perda de água livre adsorvida e compostos orgânicos voláteis, degradação completa da hemicelulose e degradação completa da celulose,^{139,140} conforme previamente relatado. Na análise do bagaço de cana-de-açúcar, verificou-se que a temperatura final do processo de degradação da hemicelulose era próxima a 290 °C. Deste modo, a temperatura de 300 °C, empregada na produção do material, foi insuficiente para que ocorresse a degradação total dessa estrutura durante o procedimento da pirólise. Este resultado é concordante com o maior rendimento obtido na síntese do material BC300, conforme apresentado na Tabela 2, o qual indicou que, nesta condição, houve menor degradação da matéria-prima, frente às temperaturas de pirólise mais elevadas que foram investigadas.

O material BC400, por sua vez, foi produzido utilizando uma temperatura superior àquela necessária para a degradação total da hemicelulose. Assim, a ausência do processo de perda de massa referente a este componente indica que ele já havia sido totalmente decomposto durante a produção do material. O processo de perda de massa acentuada observado para este material, na região entre 390 e 600 °C, pode ser atribuído a degradação da celulose remanescente,^{139,140} pós pirólise, visto que a temperatura empregada foi inferior àquela que indicou a degradação total deste componente na análise da matéria-prima.

Para os materiais produzidos empregando maiores temperaturas de pirólise, processos acentuados de perda de massa referentes a degradação da hemicelulose e da celulose não foram observados. Isso indica que estes componentes já haviam sido totalmente degradados durante a produção dos materiais, o que vai de encontro à ocorrência de maior degradação da biomassa ao se empregar temperaturas mais elevadas de pirólise.¹

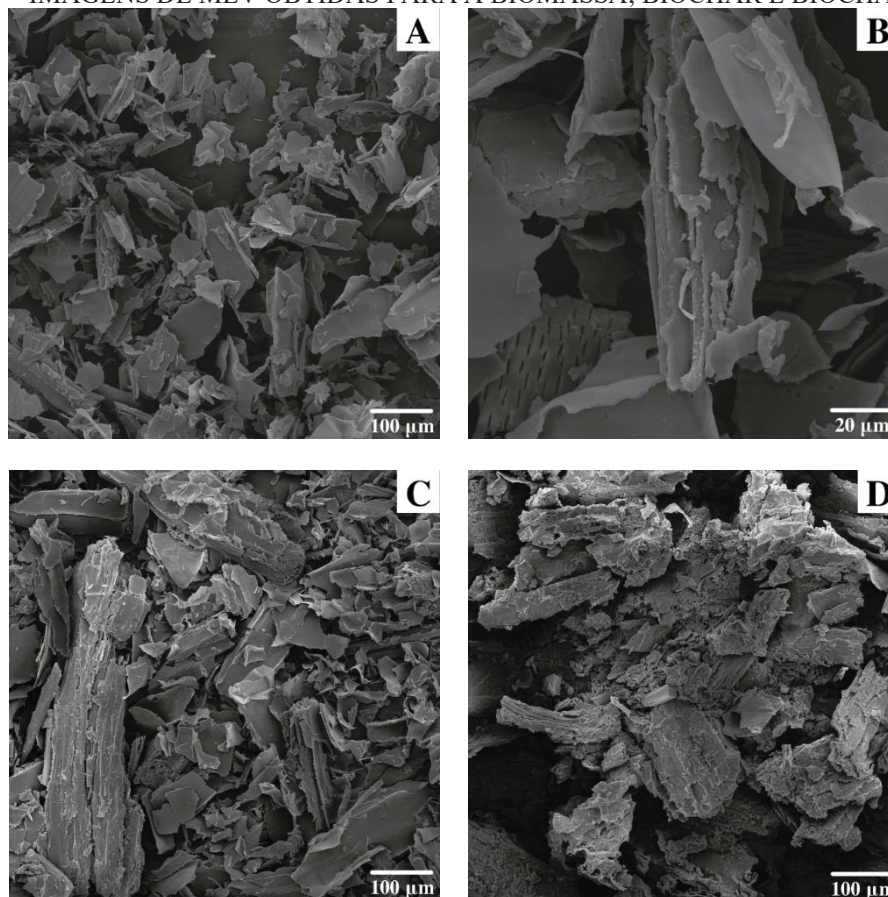
Os materiais submetidos ao procedimento de ativação apresentaram algumas diferenças no comportamento térmico, com relação aos seus precursores. Na Figura 19, pode-se observar que estes materiais, logo após o primeiro processo de perda de massa entre 25 °C e 100 °C (perda de água e compostos voláteis adsorvidos), apresentaram um processo de perda de massa adicional. Para BCA300, o surgimento deste processo não fica tão evidente devido a ocorrência concomitante do processo de degradação da hemicelulose, conforme discutido para BC300. Entretanto, quando o perfil termogravimétrico do material ativado é comparado com o do seu precursor, nota-se que o processo em questão se inicia em uma temperatura mais baixa e ocasiona uma perda de massa mais acentuada.

Para os demais materiais ativados, em especial para BCA400, a diferença no perfil termogravimétrico, com relação aos precursores, ficou mais evidenciada, observando-se uma diminuição contínua da massa com o aumento da temperatura. Este comportamento pode estar relacionado com a utilização de HNO₃ para a ativação superficial dos materiais. Conforme será discutido na sequência, este agente ácido leva a inserção de grupamentos nitrogenados, como grupos nitro (NO₂), na estrutura dos materiais. Estes compostos nitrogenados, por sua vez, são relativamente instáveis a altas temperaturas e sua liberação da estrutura carbonácea resulta na diminuição contínua na massa observada para os materiais ativados.^{141,142}

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para avaliar a morfologia do bagaço de cana-de-açúcar (biomassa) e do biochar obtido sob diferentes temperaturas de pirólise, precursor e ativado. A Figura 20 apresenta imagens representativas obtidas para a biomassa, para biochar não tratado (BC300) e para biochar ativado (BCA300).

FIGURA 20 – IMAGENS DE MEV OBTIDAS PARA A BIOMASSA, BIOCHAR E BIOCHAR ATIVADO



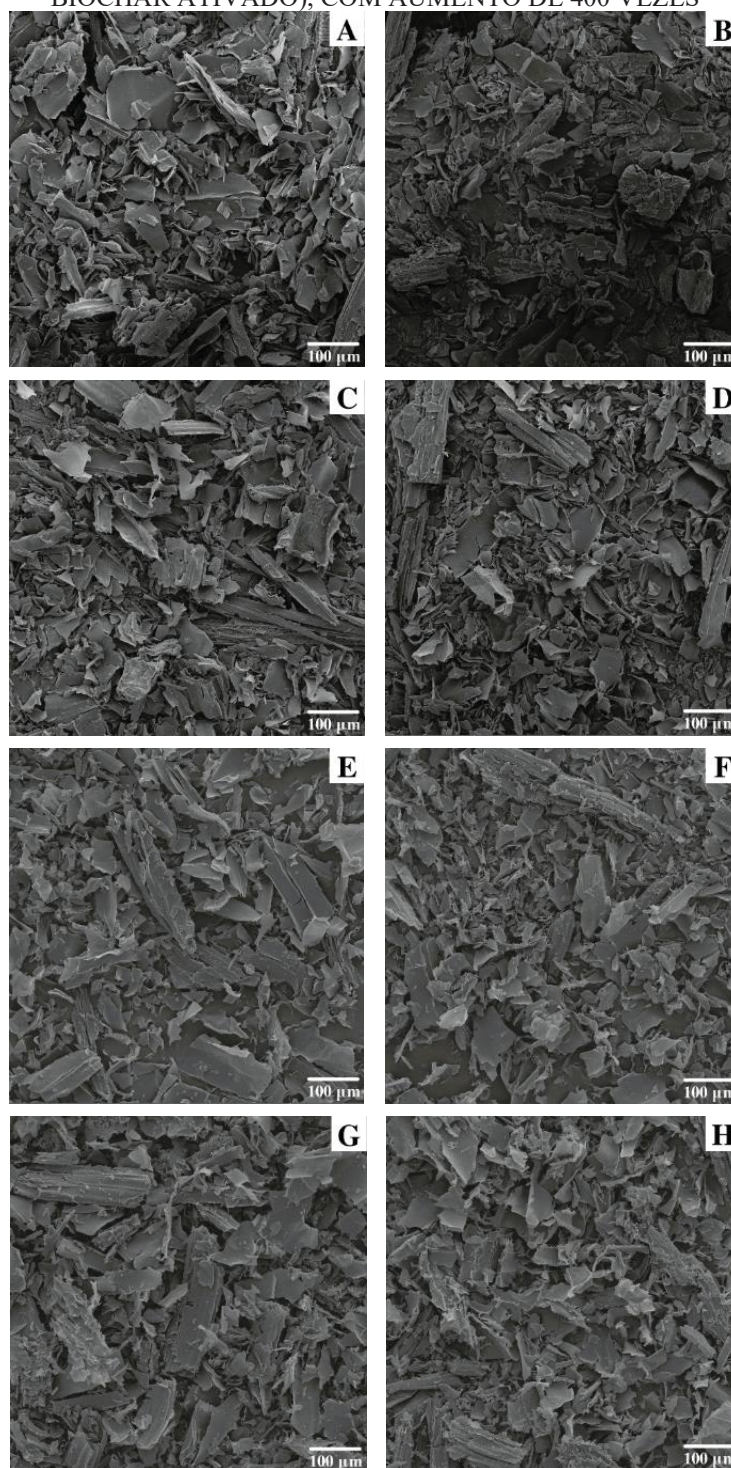
FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: (A) Biomassa, com aumento de 400 vezes;
 (B) Biomassa, com aumento de 2000 vezes;
 (C) BC300, com aumento de 400 vezes;
 (D) BCA300, com aumento de 400 vezes.

A biomassa (Figuras 20A-B) apresentou morfologia heterogênea, com estruturas no formato de placas aglomeradas e sobrepostas, que podem ter sido formadas a partir do processo de moagem das estruturas fibrosas que compunham a matéria-prima. BC300 (Figura 20C) apresentou morfologia similar à da biomassa, com aglomeração de estruturas tipo placas sobrepostas; porém, esse material apresentou maior craqueamento estrutural, resultado da liberação da matéria orgânica volátil durante a pirólise, devido a degradação da matéria-prima.^{143,144} Por fim, o material ativado, BCA300 (Figura 20D), apresentou um aspecto rugoso da superfície, o qual pode ter sido gerado devido ao efeito erosivo do agente químico ácido utilizado no processo de ativação.⁹⁷

Os demais materiais apresentaram características similares, em termos do maior craqueamento, quando os precursores são comparados à biomassa, e da maior rugosidade para os materiais ativados frente aos precursores não ativados, conforme pode ser visualizado na Figura 21. Deste modo, não foram observadas mudanças significativas na morfologia dos materiais produzidos sob diferentes temperaturas de pirólise.

FIGURA 21 – IMAGENS DE MEV OBTIDAS PARA OS DIFERENTES MATERIAIS (BIOCHAR E BIOCHAR ATIVADO), COM AUMENTO DE 400 VEZES

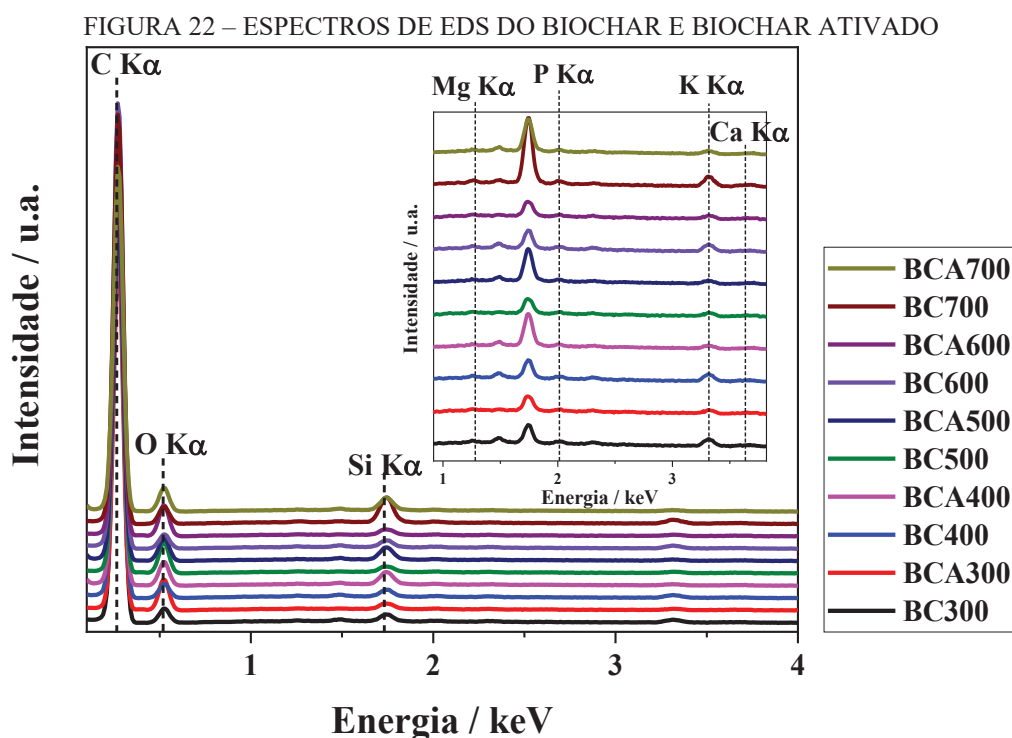


FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: (A) BC400;
(B) BCA400;
(C) BC500;
(D) BCA500;
(E) BC600;
(F) BCA600,
(G) BC700;
(H) BCA700.

4.1.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva

Medidas de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foram realizadas visando identificar qualitativamente a composição química dos diferentes materiais: biochar precursor e biochar ativado. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 22.



FONTE: A autora (2022).

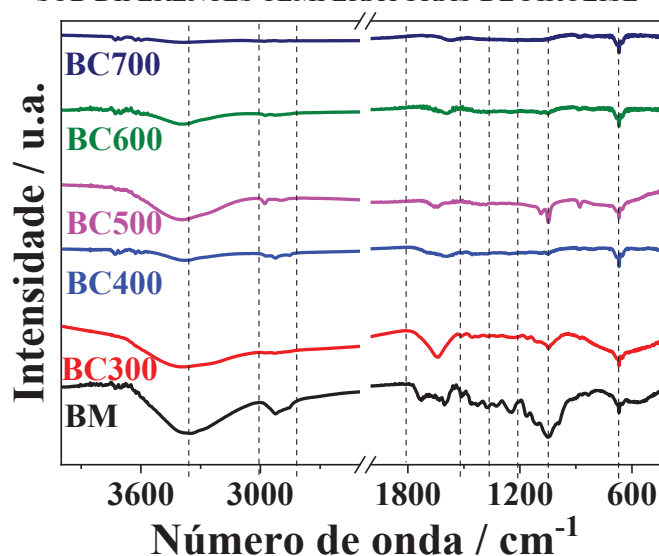
Os espectros mostram que os materiais produzidos sob diferentes temperaturas de pirólise possuem composição semelhante, com a presença majoritária dos elementos carbono e oxigênio, além de outros provenientes da matéria-prima utilizada, como silício, magnésio, fósforo, potássio e cálcio. Estes elementos são comumente encontrados em biochar produzido a partir de diversos tipos de biomassa, tal qual reportado por Kalinke *et al.*,⁹⁷ Dong *et al.*¹⁴⁵ e Wu *et al.*,¹⁴⁶ na produção do material a partir de, respectivamente, farelo de mamona, palha de milho e palha de arroz.

Observa-se ainda que os espectros dos materiais ativados, além de carbono e oxigênio, também mostraram a presença de silício, magnésio, fósforo, potássio e cálcio, o que indica que o tratamento químico com HNO₃ não levou à remoção destes elementos dos carbonáceos. Deste modo, assim como para os precursores, compostos minerais na forma de carbonatos, óxidos, silicatos e fosfatos podem estar presentes no biochar ativado.¹⁴⁷

4.1.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier

Para obter informações acerca dos grupos funcionais presentes no bagaço de cana-de-açúcar (biomassa, BM) e do biochar produzido a partir dela, em diferentes temperaturas de pirólise, antes e após o processo de ativação química, realizaram-se medidas de FTIR. Os espectros obtidos para os materiais não ativados são exibidos na Figura 23.

FIGURA 23 – ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS PARA A BIOMASSA E O BIOCHAR PRODUZIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE

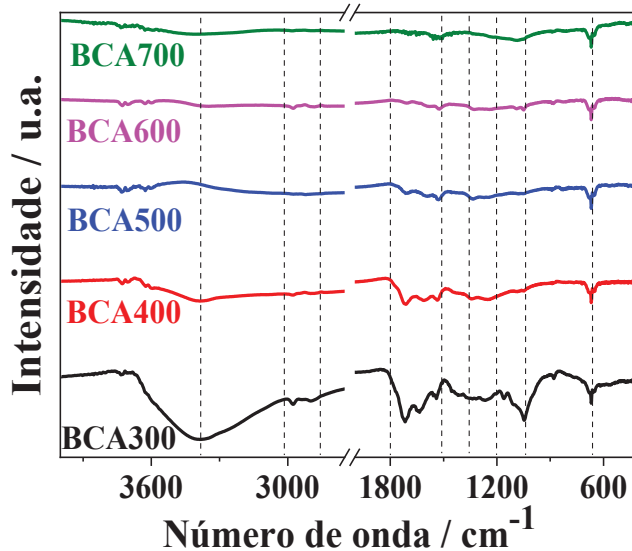


FONTE: A Autora (2021).

Nos espectros de FTIR para a biomassa e o biochar precursor, observou-se, de modo geral, que todos os materiais apresentaram bandas características de carbonáceos. Dentre elas, está a banda em torno de 3400 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da ligação O-H, cuja diminuição da intensidade com aumento da temperatura pode ter ocorrido devido ao processo de desidratação da biomassa, favorecido nessas condições. As bandas entre 3000 e 2900 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento da ligação C-H alifática: observa-se maior intensidade de sinal, nessa região, para a biomassa, enquanto para os demais materiais a intensidade é pouco significativa, indicando a degradação com o aumento da temperatura de pirólise.¹⁴⁸ Na região entre 1800 e 1500 cm^{-1} , as bandas podem ser atribuídas a alongamento da ligação C=O de ácidos carboxílicos e cetonas. A região entre 1400 e 1200 cm^{-1} pode ser associada à diversos grupamentos, o que pode ocasionar sobreposição de bandas; porém, no caso da biomassa, pode-se atribuir essas bandas a grupos -OH de ácidos carboxílicos e fenóis, presentes na estrutura lignocelulósica. A banda em torno de 1035 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C-O e ao modo de dobramento O-H de fenóis e ácidos carboxílicos. Por fim, para todos os materiais, observou-se a banda próxima a 670 cm^{-1} , característica de

vibrações de deformação fora do plano de grupamentos C-H em estruturas aromáticas.¹⁴⁹ Similarmente, essas bandas características puderam ser visualizadas nos espectros de FTIR para o biochar submetido ao processo de ativação química (Figura 24).

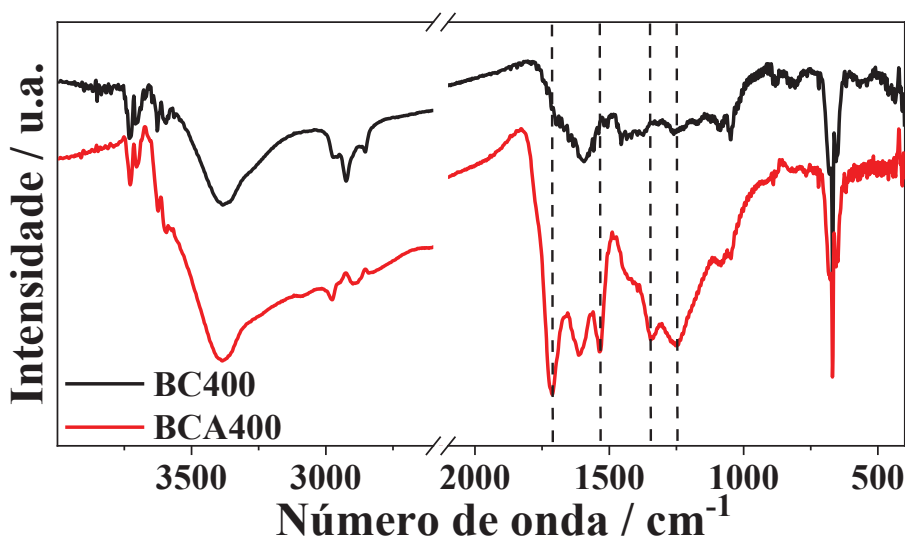
FIGURA 24 – ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS PARA O BIOCHAR PRODUZIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE E SUBMETIDO AO PROCEDIMENTO DE ATIVAÇÃO QUÍMICA



FONTE: A Autora (2021).

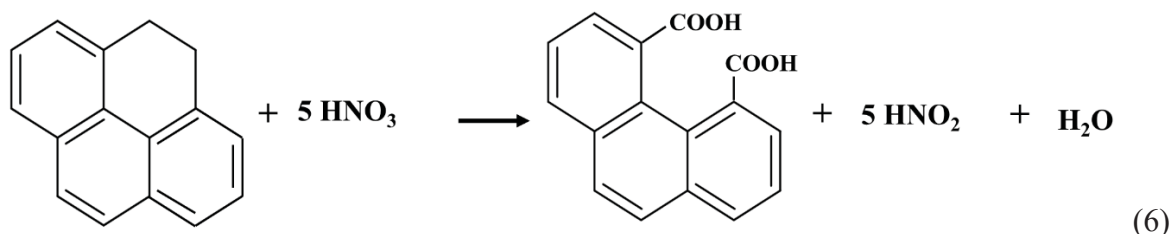
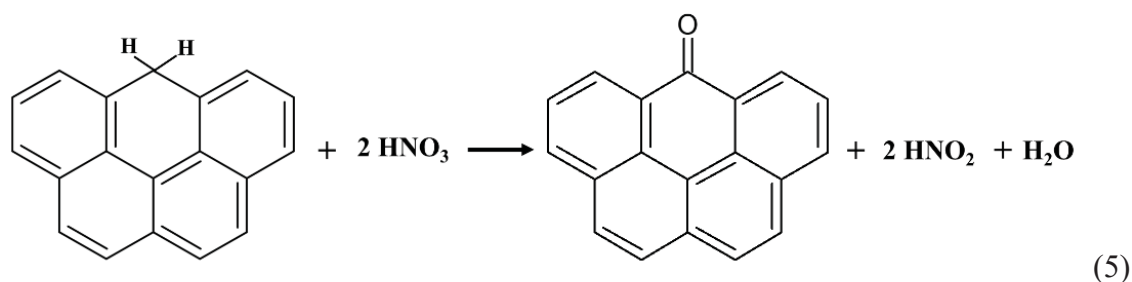
Verifica-se, ainda, modificações nos espectros, quando comparados os materiais precursores com aqueles que foram submetidos ao processo de ativação química, as quais relacionam-se aos grupos funcionais presentes em cada estrutura. Na Figura 25, apresenta-se os espectros referentes aos materiais BC400 e BCA400, de modo que essas diferenças podem ser visualizadas com mais detalhes.

FIGURA 25 – ESPECTROS DE FTIR DOS MATERIAIS BC400 E BCA400



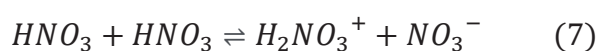
FONTE: A Autora (2021).

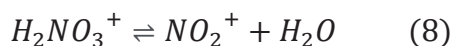
Nos espectros da Figura 25, observa-se que, após o procedimento de ativação química, outros grupos foram gerados na superfície do biochar. Dentre as bandas que o biochar ativado (BCA400) apresentou, que se diferenciavam daquelas do biochar precursor (BC400), destacam-se as próximas a 1710 cm^{-1} e a 1250 cm^{-1} , que conforme discutido anteriormente, correspondem a estiramentos C=O de ácidos carboxílicos e cetonas e vibrações de grupos -OH de ácidos carboxílicos e fenóis, respectivamente; ou seja, são indicativos da oxidação da estrutura carbonácea. Nas propostas de mecanismo de oxidação do biochar utilizando ácido nítrico, sugere-se que as cadeias alifáticas são passíveis de reagir, enquanto os anéis aromáticos permanecem inalterados, dada a alta estabilidade dos mesmos: se a cadeia alifática for formada por um átomo de carbono, a oxidação levará a formação de grupos cetona (5), enquanto que se mais de um átomo de carbono fizer parte da cadeia alifática, serão formados grupos dicarboxílicos (6).^{150,151}



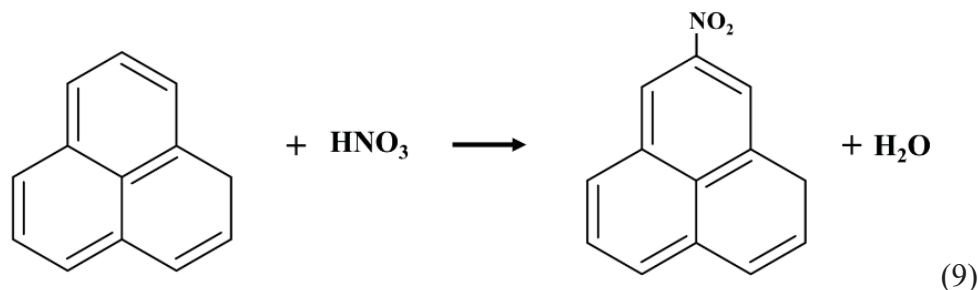
FONTE: Adaptado de Ternero-Hidalgo *et al.*¹⁵⁰

Observa-se, ainda, nos espectros da Figura 25, que há, para o material ativado, as bandas em torno de 1530 cm^{-1} e 1340 cm^{-1} , associadas a estiramentos simétrico e assimétrico do $-\text{NO}_2$, respectivamente, indicando a presença de grupamentos nitro na superfície do material. Dessa forma, sugere-se que, no procedimento de ativação química com HNO_3 , as reações de nitração ocorrem simultaneamente às reações de oxidação. A nitração de estruturas carbonáceas aromáticas ocorre por um mecanismo de substituição eletrofílica aromática. Para tal, inicialmente formam-se íons nitrônio (NO_2^+), a partir da reação de autoprólise do ácido nítrico (7 e 8):





Estes atuam como eletrófilos e, pelo mecanismo de reação previamente citado, levam a inserção de um grupo nitro na estrutura carbonácea (9).¹⁵⁰



FONTE: Adaptado de Ternero-Hidalgo *et al.*¹⁵⁰

4.1.6 Estimativa de Grupos Ácidos Superficiais

Os grupamentos ácidos totais (carboxílicos, fenólicos e lactônicos) presentes na superfície das amostras de biochar foram quantificados com base no método de Boehm, utilizando um procedimento de retrotitulação. Para isso, uma quantidade conhecida de NaOH foi adicionada aos materiais, para neutralização dos grupamentos ácidos superficiais presentes, seguido da adição de um excesso de HCl. Na sequência, realizou-se a retrotitulação potenciométrica, empregando NaOH como agente titulante. As quantidades de grupos ácidos totais para os materiais com e sem ativação são apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3 – GRUPAMENTOS ÁCIDOS TOTAIS PRESENTES NO BIOCHAR PRODUZIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE, NÃO ATIVADO E ATIVADO

Temperatura de pirólise (°C)	Grupos ácidos totais (mmol g ⁻¹)	
	Não ativado	Ativado
300	6,8 ± 0,2 ₃	7,6 ± 0,1 ₂
400	5,2 ± 0,3 ₁	6,9 ± 0,2 ₉
500	---	5,1 ± 0,1 ₀
600	---	4,6 ± 0,3 ₀
700	---	3,8 ± 0,2 ₀

FONTE: A autora (2021).

Observa-se, dentre os materiais que não foram submetidos ao procedimento de ativação, que as maiores quantidades de grupamentos ácidos totais foram obtidas para aqueles preparados utilizando as menores temperaturas de pirólise (BC300 e BC400). No caso de BC500, BC600 e BC700, não havia grupamentos presentes em quantidades suficientes que pudessem ser determinadas pelo método empregado. A quantidade desses grupos é influenciada pela matéria-prima utilizada e pelas condições de pirólise,

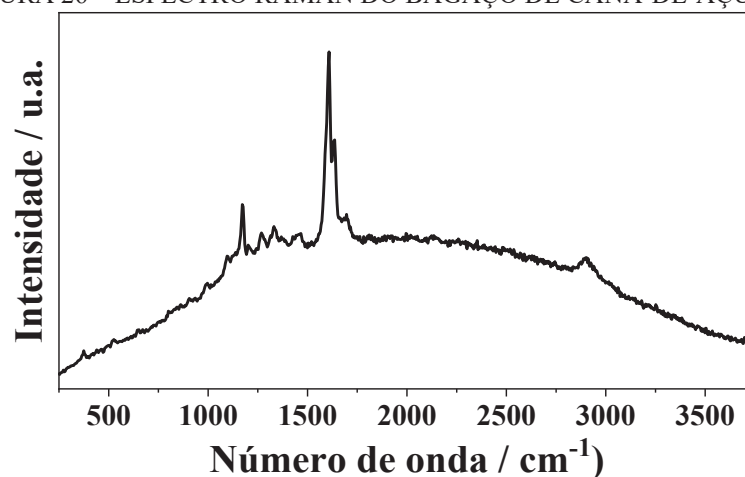
especialmente em termos da temperatura. Deste modo, a menor degradação sofrida pelos materiais nas menores temperaturas de pirólise, conforme discutido na caracterização do perfil termogravimétrico (Figura 19), leva a obtenção de materiais com maiores quantidades de grupamentos de caráter ácido.¹ Esse resultado é condizente com outros reportados na literatura. Mukherjee *et al.*,¹⁵² por exemplo, prepararam o biochar a partir de três tipos de biomassa (carvalho, pinho e capim) em diferentes temperaturas de pirólise e observaram, por meio da titulação de Boehm, grupamentos ácidos totais cujas quantidades variaram de 4,4 a 8,1 mmol g⁻¹, respectivamente, para o maior e o menor valores de temperaturas investigados. A tendência de diminuição na quantidade de grupamentos ácidos com o aumento da temperatura de pirólise também foi observada por Suliman *et al.*,¹⁵³ na caracterização de biochar obtido a partir de diferentes tipos de madeira, em diferentes temperaturas de pirólise.

Além disso, nota-se que o biochar submetido ao tratamento de ativação química apresentou um aumento na quantidade de grupos funcionais ácidos, sendo possível, inclusive, a determinação nos materiais preparados utilizando as maiores temperaturas de pirólise. Isto pode ter relação com a utilização do HNO₃ como agente de ativação, o qual leva a inserção de grupamentos com essas características por meio da oxidação da estrutura carbonácea,¹⁵⁰ conforme discutido anteriormente (Figura 20). Resultados similares foram relatados por Kalinke *et al.*⁵⁶ e Oliveira *et al.*,⁵⁷ de modo que o aumento da quantidade desses grupamentos favoreceu a pré-concentração dos analitos investigados e possibilitou, posteriormente, a obtenção de resultados com melhor definição na etapa de determinação voltamétrica.

4.1.7 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi utilizada para caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar (biomassa), o biochar produzido sob diferentes temperaturas de pirólise, não ativado e ativado, e também grafite e grafite ativado utilizando o procedimento proposto para os derivados de lignocelulose. Um espectro representativo obtido para a biomassa é apresentado na Figura 26.

FIGURA 26 – ESPECTRO RAMAN DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

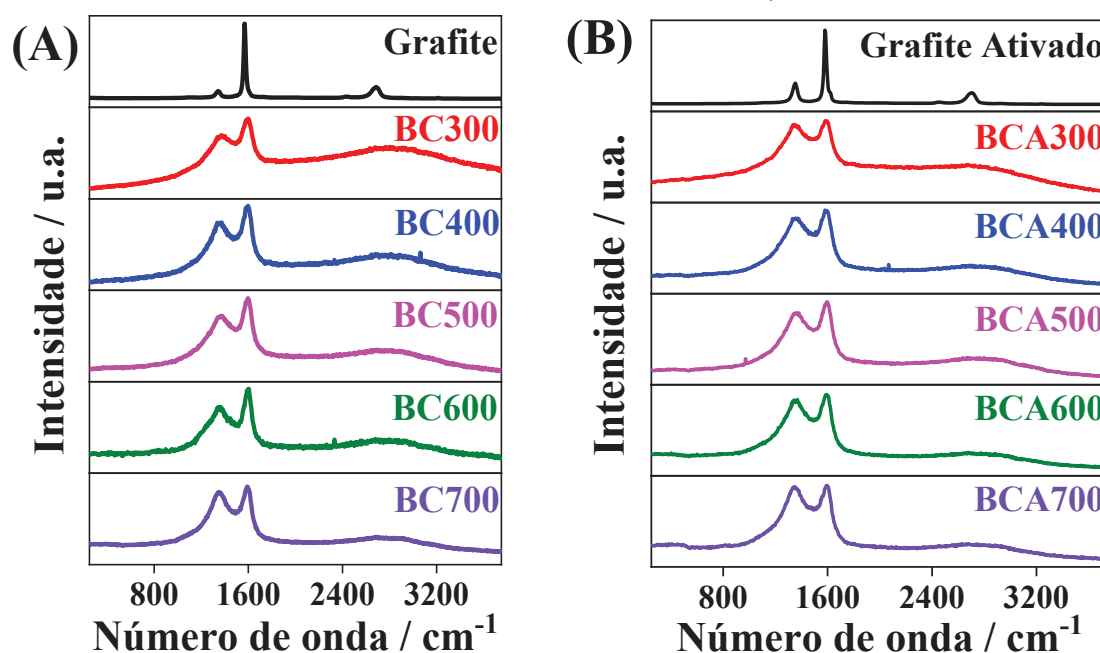


FONTE: A autora (2022).

No espectro, observa-se bandas características da lignina que compõe a estrutura da matéria-prima, como a banda em aproximadamente 1169 cm^{-1} , referente ao dobramento COH e vibrações do esqueleto aromático. A banda em cerca de 1185 cm^{-1} , por sua vez, está relacionada a vibrações de grupos metóxi e dobramentos COH no plano. Já as bandas em aproximadamente 1256 e 1268 cm^{-1} , relacionam-se, respectivamente, a alongamentos da ligação CO e vibrações do esqueleto aromático e vibrações de grupos metóxi. A banda em 1331 cm^{-1} , além de ser um indicativo de alongamento da ligação -OH alifática em lignina, indica também o dobramento das ligações HCC e HCO aromáticas em celulose, outro componente da estrutura da biomassa. A banda de maior intensidade, localizada próximo a 1600 cm^{-1} também é característica de lignina e está relacionada a vibrações do esqueleto aromático. Por fim, a banda em aproximadamente 1890 cm^{-1} é relativa a alongamentos de ligações CH e CH₂ de celulose.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶

Para os diferentes materiais produzidos (biochar e biochar ativado), as bandas de componentes lignocelulósicos deram lugar a bandas características de estruturas carbonáceas, observadas também nos espectros do grafite e do grafite ativado (Figura 27): a banda G ($\sim 1590\text{ cm}^{-1}$) está relacionada ao movimento de estiramento no plano de ligações de átomos de carbono com hibridização sp^2 ; por sua vez, a banda D ($\sim 1350\text{ cm}^{-1}$), característica de materiais carbonáceos amorfos, está relacionada a desordens na estrutura grafítica sp^2 , devido à presença de falhas ou heteroátomos que geram defeitos sp^3 .^{143,157} Quando as razões entre as intensidades das bandas D e G (I_D/I_G) para o grafite ($0,125 \pm 0,024_8$) e para o grafite ativado ($0,196 \pm 0,084_9$) são comparadas, não se observa diferença estatística entre as médias ($t_{\text{observado}} = 1,39 < t_{\text{crítico}(0,05;3)} = 3,182$). Isto é um indicativo de que o procedimento de ativação utilizado foi relativamente brando quanto a oxidação da estrutura grafítica.

FIGURA 27 - ESPECTROS RAMAN PARA O GRAFITE, GRAFITE ATIVADO E BIOCHAR PRODUZIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE, NÃO ATIVADO E ATIVADO



FONTE: A autora (2022).
 LEGENDA: (A) Materiais não ativados;
 (B) Materiais ativados.

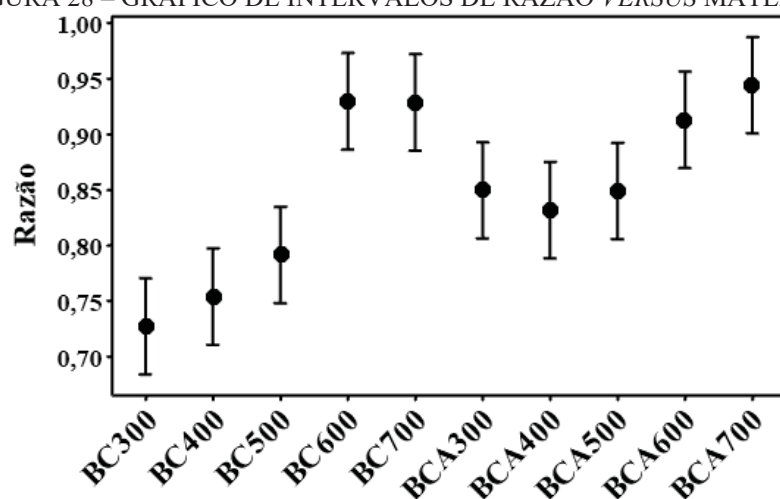
Nos espectros, há também a presença da banda G' (ou 2D) em aproximadamente 2700 cm^{-1} , que se relaciona à organização estrutural no plano, e da combinação dos modos D+G ($\sim 2930\text{ cm}^{-1}$). Para os materiais produzidos (biochar e biochar ativado), estas bandas não possuem máximos bem definidos, representando, portanto, halos amorfos.^{143,157}

Devido a sobreposição das bandas, os espectros de biochar e biochar ativado foram deconvoluídos utilizando duas gaussianas sobre uma linha base e, a partir daí, obtiveram-se os valores de intensidade das bandas D e G para o cálculo de I_D/I_G . Uma análise de variância (ANOVA) de fator único foi utilizada para comparação das médias de I_D/I_G dos diferentes materiais e o agrupamento foi realizado utilizando o método de Tukey, no nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4 e na Figura 28. Nesta última, os intervalos foram calculados a partir do desvio-padrão combinado.

TABELA 4 – VALORES DE I_D/I_G PARA O BIOCHAR PRODUZIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE, NÃO ATIVADO E ATIVADO

Temperatura de pirólise (°C)	I_D/I_G	
	Não ativado	Ativado
300	$0,729 \pm 0,008_7^D$	$0,85 \pm 0,02_{A,B,C}$
400	$0,76 \pm 0,014_{C,D}$	$0,83 \pm 0,04_{B,C}$
500	$0,80 \pm 0,04_1_{C,D}$	$0,85 \pm 0,03_{A,B,C}$
600	$0,93 \pm 0,05_0^{A,B}$	$0,91 \pm 0,05_4^{A,B}$
700	$0,929 \pm 0,009_6^A$	$0,94 \pm 0,05_0^{A,B}$

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes, no nível de confiança de 95%.
 FONTE: A autora (2022).

FIGURA 28 – GRÁFICO DE INTERVALOS DE RAZÃO *VERSUS* MATERIAL

FONTE: A autora (2022).

Para os materiais que não foram submetidos ao procedimento de ativação (Figura 27A), observou-se, a formação de dois agrupamentos de acordo com os valores de I_D/I_G : um deles formado pelos materiais BC300, BC400 e BC500, e o outro pelos materiais BC600 e BC700. O segundo grupo apresentou valor de razão mais elevado; ou seja, de modo geral, ocorreu um aumento do valor de I_D/I_G conforme se aumentou a temperatura de pirólise, tal qual é reportado em trabalhos da literatura que realizaram a produção de biochar a partir de diferentes tipos de matéria-prima.^{158,159} De acordo com Ferrari e Robertson,¹⁵⁷ para pequenos valores de diâmetro de aglomerados sp^2 , assim como ocorre para os materiais amorfos, a força do modo D é proporcional à probabilidade de se encontrar um anel hexagonal no aglomerado; deste modo, para carbonos amorfos, o desenvolvimento da banda D indica ordenamento, exatamente o oposto do caso do grafite. Portanto, infere-se que houve ordenamento da estrutura do biochar com o aumento da temperatura empregada na pirólise.^{1,160}

Os materiais ativados apresentaram médias de I_D/I_G estatisticamente iguais; porém, na Figura 28, ainda é possível observar uma tendência de divisão das razões entre dois agrupamentos, de modo similar aos seus precursores. Quando os materiais ativados e precursores são comparados, apenas BC300 e BCA300 apresentam médias de I_D/I_G estatisticamente diferentes, sendo o valor obtido mais elevado para o material ativado. Nas caracterizações anteriores, especialmente na análise termogravimétrica, verificou-se que o biochar produzido sob temperatura de pirólise de 300 °C foi o material, dentre os precursores, que sofreu menor degradação estrutural, possuindo ainda resquícios de hemicelulose em sua estrutura. Assim, quando o material entrou em contato com HNO_3 no procedimento de ativação, além da oxidação e da nitração da superfície do material, o

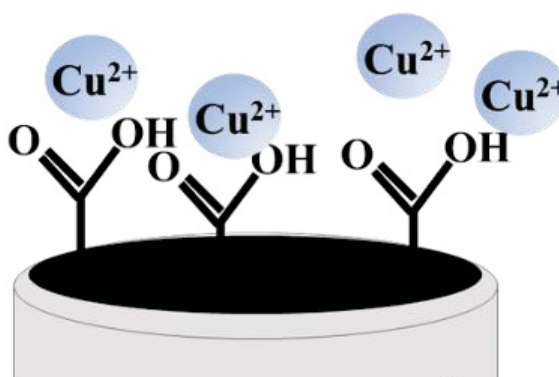
reagente pode ter ocasionado a hidrólise ácida da hemicelulose. Essa reação leva a quebra da estrutura do polissacarídeo, formando as pentoses e hexoses correspondentes.¹⁶¹⁻¹⁶³ Assim, uma possível explicação para o comportamento observado é que esse processo pode ter ocasionado a diminuição da quantidade de heteroátomos de oxigênio no material. Isto, por sua vez, contribuiu para a organização estrutural, refletindo em um valor mais elevado de I_D/I_G para BCA300 com relação ao seu precursor. De modo a confirmar esta hipótese, caracterizações adicionais dos materiais deveriam ser realizadas para verificar mais detalhadamente a composição elementar (semi) quantitativa dos grupamentos presentes nas mesmas; entretanto, visto que o foco do trabalho está mais atrelado a aplicação dos materiais produzidos, optou-se por não realizar estas análises extras.

Os demais materiais ativados apresentaram médias de I_D/I_G estatisticamente iguais a seus precursores. Esse comportamento indica que a oxidação e nitração da estrutura carbonácea do biochar, pós procedimento de ativação com HNO_3 , não interferiu nas características destes materiais passíveis de observação pela técnica de espectroscopia Raman.

4.1.8 Conclusões Parciais

A produção de biochar a partir de bagaço de cana-de-açúcar e a variação das condições do processo, em termos de temperatura de pirólise, e o emprego do procedimento posterior de ativação com HNO_3 permitiram a obtenção de materiais com diferentes características. De modo geral, observou-se diminuição do rendimento da síntese conforme se aumentou a temperatura de pirólise, de 300 a 700 °C, sendo este um indicativo de aumento da degradação nas maiores temperaturas. Esta observação foi concordante com os resultados obtidos nas análises termogravimétricas, que mostraram um número maior de processos de perda de massa para os materiais produzidos sob as menores temperaturas de pirólise. Ademais, o perfil termogravimétrico dos materiais ativados indicou a liberação de NO_2 , possivelmente agregado à estrutura por meio do procedimento de ativação. Nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, verificou-se maior craqueamento das estruturas do biochar, com relação a biomassa, devido a liberação de compostos voláteis na pirólise, e maior rugosidade para os materiais ativados, possivelmente devido ao efeito erosivo do agente de ativação empregado. A caracterização por espectroscopia de energia dispersiva mostrou a presença qualitativa dos elementos carbono, oxigênio, silício, magnésio, fósforo, potássio e cálcio em todos os materiais, indicando que o tratamento ácido

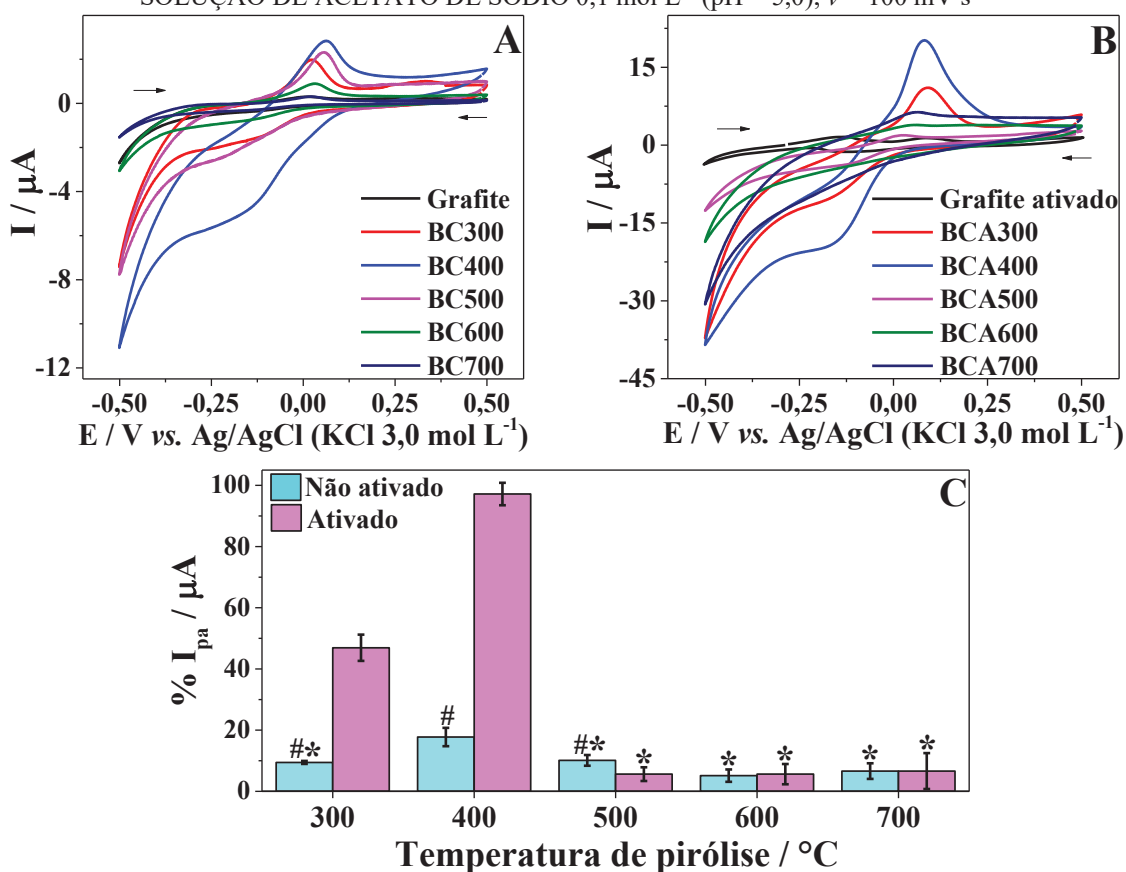
não resultou na lixiviação de substâncias inorgânicas dos mesmos. Por sua vez, a espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier indicou a presença de grupamentos oxigenados nos diferentes materiais, além da ocorrência da oxidação e da nitração da estrutura dos materiais que foram ativados com HNO_3 . Concordantemente, a estimativa dos grupos ácidos superficiais indicou aumento no número desses grupos para os materiais que foram ativados, com relação aos precursores. Para estes, a diminuição na quantidade de grupos para os materiais produzidos sob maiores temperaturas, mais uma vez, indicou aumento da degradação com o aumento no valor deste parâmetro no preparo dos materiais. Adicionalmente, a caracterização por espectroscopia Raman indicou maior organização estrutural com o aumento da temperatura de pirólise, corroborando as observações realizadas pelas demais técnicas.

SEÇÃO 4.2:**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ÍONS COBRE (II)
UTILIZANDO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO
MODIFICADO COM BIOCHAR**

4.2.1 Avaliação da Potencialidade de Pré-Concentração de Cu^{2+} pelos Diferentes Materiais para Posterior Determinação Voltamétrica

Para avaliar a potencialidade analítica dos materiais produzidos a partir do bagaço de cana-de-açúcar na pré-concentração de Cu^{2+} e posterior determinação voltamétrica, biochar e biochar ativado foram utilizadas para a construção de eletrodos de pasta de carbono modificados (EPCM). Para fins comparativos, a resposta de eletrodos de pasta de carbono não modificado (grafite) e de eletrodos de pasta de carbono modificado com grafite ativado por meio do procedimento utilizado para o biochar também foi investigada. Voltamogramas cíclicos representativos para cada material são apresentados na Figura 29.

FIGURA 29 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E COMPARATIVO PERCENTUAL DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} , EMPREGANDO O ELETRODO DE PASTA DE CARBONO E OS ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO MODIFICADOS COM OS DIFERENTES MATERIAIS PRODUZIDOS; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Grafite e biochar;

(B) Grafite ativado e biochar ativado;

(C) Comparativo das correntes de pico anódico; médias que compartilham um símbolo são significativamente iguais.

Nos voltamogramas das Figuras 29A e 29B, observa-se que todos os materiais possibilitaram a obtenção de um sinal no sentido do processo anódico. As médias das respostas em termos de percentual de corrente de pico anódico (I_{pa}) foram comparadas utilizando uma análise de variância (ANOVA) de fator único e o teste de Tukey foi aplicado para verificar o agrupamento das respostas, em nível de confiança de 95 %. De modo geral, para os materiais precursores, as respostas de BC300, BC400 e BC500 foram estatisticamente iguais, enquanto observou-se diminuição na intensidade de I_{pa} para BC600 e BC700, cujas respostas foram iguais entre si. Nas caracterizações, verificou-se que, de modo geral, ao se empregar as menores temperaturas de pirólise, houve menor degradação estrutural, resultando em materiais com maiores quantidades de grupos ácidos totais. Estes incluem grupos oxigenados, que, por sua vez, podem ter favorecido a pré-concentração do analito, o que, posteriormente, refletiu no sinal mais intenso na etapa de determinação voltamétrica.^{54,96}

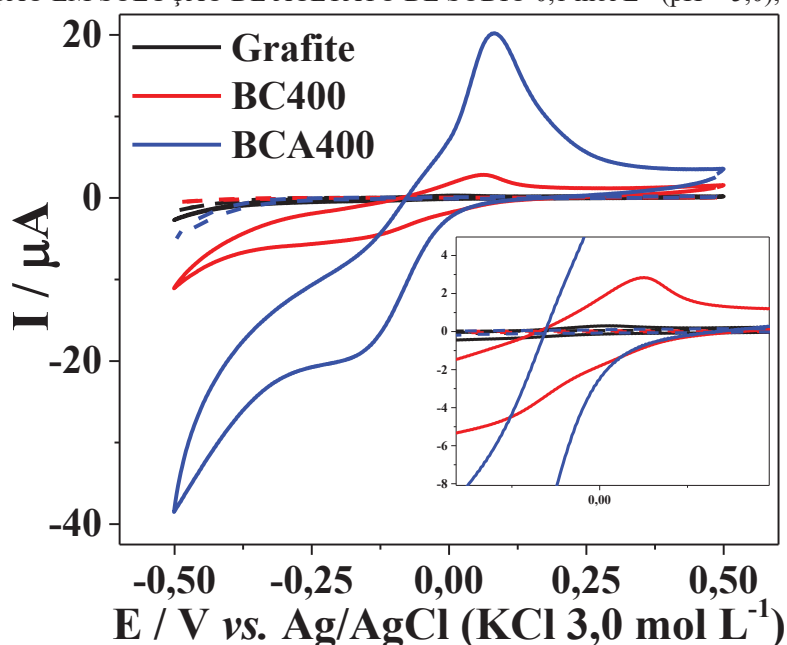
Quando os materiais ativados foram utilizados, não houve diferença significativa ao se empregar BCA500, BCA600 e BCA700, com relação a resposta de seus precursores, a si mesmos e a BC300. Considerando também os resultados obtidos na caracterização da quantidade de grupos ácidos superficiais, verifica-se que estes materiais ativados apresentam um número maior deste tipo de grupamento, comparado aos precursores. Entretanto, a incorporação destes, via oxidação da estrutura carbonácea, conforme exibido nos resultados de FTIR, possivelmente não ocorreu em quantidade suficiente que propiciasse mais sítios de interação com a espécie de interesse, levando a ausência de diferença entre as respostas.

Por outro lado, os materiais ativados BCA300 e BCA400 apresentaram resposta significativamente diferente daquela de seus precursores e entre si, além dos valores de corrente de pico relativa serem os mais elevados dentre o conjunto investigado. Estes materiais apresentaram características que apontaram para uma maior desorganização estrutural, comparados àqueles produzidos sob maiores temperaturas, ativados ou não. Além disso, na estimativa da quantidade de grupos ácidos superficiais, estes materiais apresentaram os valores mais elevados, sendo este um indicativo de que a inserção de maior quantidade de grupos superficiais nesses materiais, após a ativação com HNO_3 , possibilitou uma interação mais efetiva com o analito. O material BCA300, mesmo sendo aquele que continha a maior quantidade de grupos ácidos superficiais, forneceu a segunda resposta mais elevada em termos de corrente de pico anódico. Isto pode estar relacionado com a presença de hemicelulose na sua estrutura, conforme verificado nas análises termogravimétricas. Assim, a menor decomposição térmica do material e a maior desorganização estrutural

podem ter levado a obtenção de um eletrodo modificado com menor condutividade, resultando em um valor de corrente de pico menos elevado, frente a BCA400.

Isto posto, a resposta de corrente de pico anódico de maior magnitude foi obtida ao se empregar o material BCA400 como modificador de eletrodo. De modo a se observar mais detalhadamente o comportamento eletroquímico do eletrodo de pasta de carbono modificado com este material, em comparação ao seu precursor e ao eletrodo de pasta de carbono não modificado (grafite), voltamogramas cíclicos representativos são apresentados na Figura 30.

FIGURA 30 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O ELETRODO DE PASTA DE CARBONO NÃO MODIFICADO E MODIFICADO COM BC400 E BCA400. AS LINHAS TRACEJADAS REPRESENTAM MEDIDAS FEITAS NA AUSÊNCIA DO ANALITO E AS LINHAS CHEIAS REPRESENTAM MEDIDAS PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$



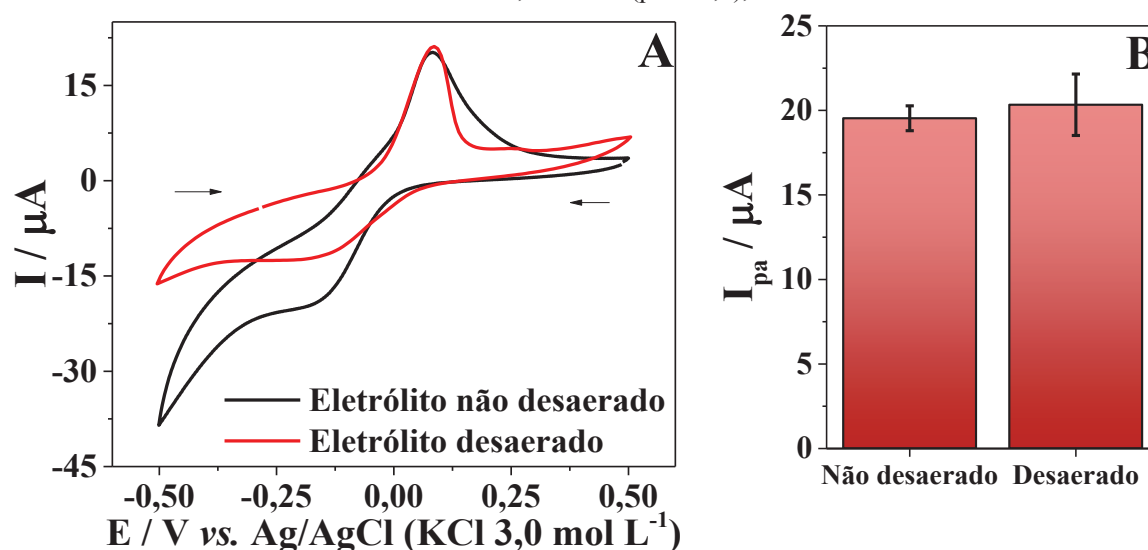
FONTE: A Autora (2021).

Nota-se que, para todos os casos, na ausência do analito (linhas tracejadas), não foram observados sinais referentes a processos redox. Entretanto, após a etapa de pré-concentração de Cu^{2+} (linhas cheias), picos nos sentidos dos processos anódico ($E_{\text{pa}} \approx 0,06 \text{ V}$) e catódico ($E_{\text{pc}} \approx -0,15 \text{ V}$) foram observados. Os valores de corrente de pico foram pequenos para o eletrodo não modificado, indicando que não houve pré-concentração significativa nesse caso. Por outro lado, os sinais apresentados por ambos os EPCM foram superiores quando comparados com o eletrodo de pasta de carbono, sendo as correntes de pico em ambos os sentidos da varredura de maior magnitude para o material ativado BCA400. Reitera-se que esse comportamento pode ser explicado devido à presença da maior quantidade de grupos superficiais, pós ativação química, que interagem de modo mais

efetivo com o analito, promovendo a pré-concentração de maior quantidade de íons e, posteriormente, a resposta referente aos processos redox do cobre: $Cu^0 \rightleftharpoons Cu^{2+} + 2e^-$.⁹⁷

Na sequência, verificou-se o perfil voltamétrico para a determinação de Cu^{2+} utilizando o eletrodo modificado com BCA400, na presença e na ausência de O_2 no meio de análise, isto é, em eletrólito não desaerado e desaerado com N_2 . Voltamogramas cíclicos representativos são apresentados na Figura 31.

FIGURA 31 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E COMPARATIVO DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDOS PARA O ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM BCA400, PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} EM ELETRÓLITO SUPORTE NÃO DESAERADO E DESAERADO POR 300 s COM N_2 ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

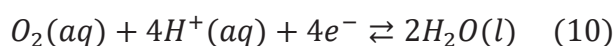


FONTE: A Autora (2022).

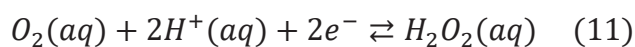
LEGENDA: (A) Voltamogramas cíclicos;

(B) Comparativo de corrente de pico anódico.

Para a medida realizada no eletrólito não desaerado, observou-se um perfil voltamétrico característico de descarga no sentido da varredura catódica. Visto que para a medida realizada no eletrólito desaerado este perfil não foi observado, ele pode ser associado à presença de O_2 na solução. Na literatura, propõe-se que o oxigênio pode ser reduzido à água por uma reação que envolve quatro elétrons (10),



ou à peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por uma reação que envolve dois elétrons (11):



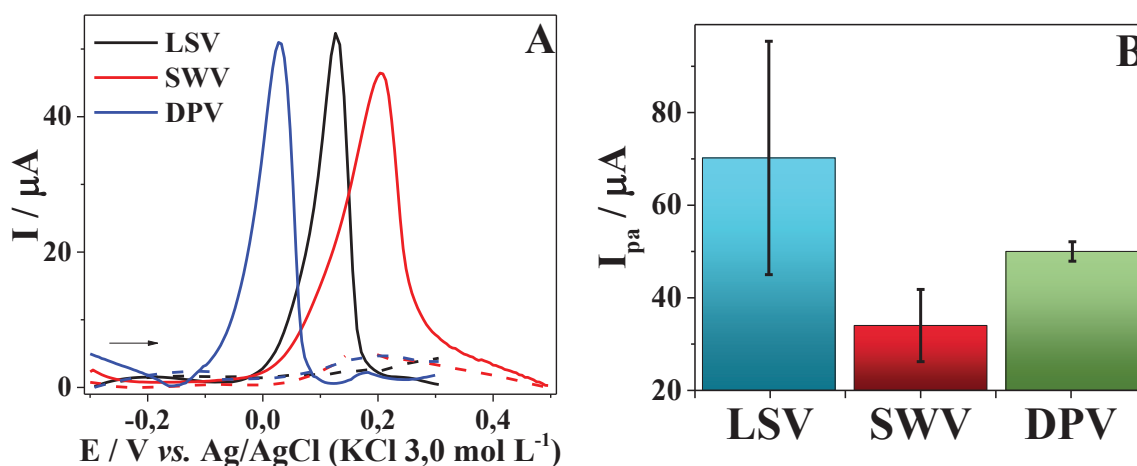
Assim, a transferência de elétrons relativa a esses processos pode estar ocasionando o perfil de corrente observado no meio no qual não se realizou a desaeração.^{164,165}

Entretanto, quando se comparou as intensidades de corrente de pico anódico obtidas nas duas situações, não se observou diferença significativa entre as médias ($t_{\text{observado}} = 0,71 < t_{\text{crítico}}(0,05;2) = 4,303$). Assim, mesmo que os perfis voltamétricos na ausência e na presença de O_2 sejam diferentes, não houve diferença quanto ao sinal, em termos de corrente de pico anódico, para a determinação do analito. Sendo assim, na continuidade dos estudos, optou-se por não realizar o procedimento de desaeração do eletrólito suporte.

4.2.2 Avaliação da Modalidade de Técnica Voltamétrica para Determinação de Cu^{2+}

O biochar preparado em $400\text{ }^{\circ}C$ e ativado (BCA400) foi o que forneceu a melhor resposta na voltametria cíclica para a determinação de íons Cu^{2+} . Utilizando este material, realizou-se um estudo para definir qual técnica voltamétrica, dentre voltametria de varredura linear (LSV), voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV), seria mais adequada, em termos de potencial e corrente de pico, para o desenvolvimento de um método de determinação do analito. Voltamogramas representativos obtidos para cada uma das técnicas são apresentados na Figura 32.

FIGURA 32 - VOLTAMOGRAMAS E COMPARATIVO DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE $100\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0) APÓS PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min; PREVIAMENTE A VARREDURA VOLTAMÉTRICA, O ELETRODO FOI SUBMETIDO A UM POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3\text{ V}$ POR 60 s. LINHAS TRACEJADAS REPRESENTAM MEDIDAS FEITAS NA AUSÊNCIA DO ANALITO



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas de varredura linear ($v = 50\text{ mV s}^{-1}$; $step = 7,44\text{ mV}$), onda quadrada ($step = 5,0\text{ mV}$, $a = 20\text{ mV}$ e $f = 25\text{ Hz}$) e pulso diferencial ($a = 100\text{ mV}$, $t_p = 200\text{ ms}$, $v = 10\text{ mV s}^{-1}$);

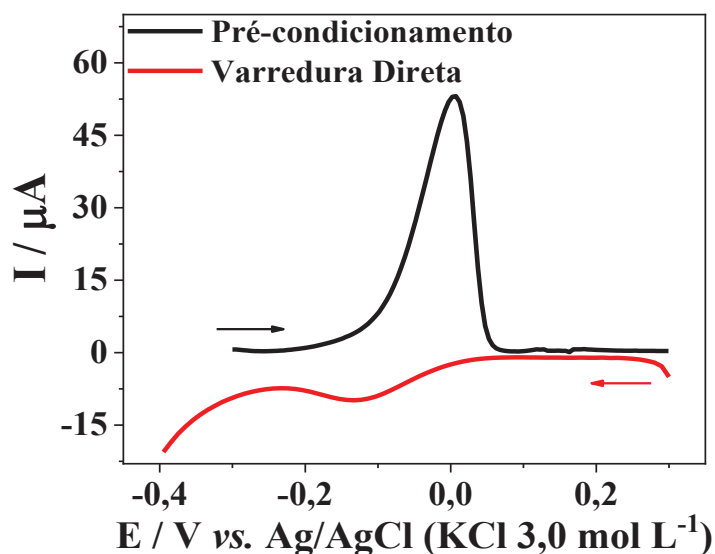
(B) Comparativo de corrente de pico anódico.

Observou-se um deslocamento no potencial de pico para valores mais positivos (sentido anódico) quando se aplicou as técnicas de DPV ($E_{pa} = 0,06$ V), LSV ($E_{pa} = 0,12$ V) e SWV ($E_{pa} = 0,20$ V). Este comportamento pode estar relacionado não só com os diferentes modos de aplicação de potencial característicos das técnicas, mas também com a velocidade de varredura empregada em cada uma delas: 10 mV s^{-1} para DPV, 50 mV s^{-1} para LSV e 125 mV s^{-1} para SWV. De modo geral, reações eletroquímicas demandam um determinado tempo para assegurar a transferência de carga na superfície do eletrodo e, quanto maior a velocidade de varredura de potencial empregada, mais limitado é o intervalo de tempo para que isso ocorra. Para reações cuja cinética é rápida, o efeito da varredura é menos significativo e não é verificada alteração no potencial de pico para os processos faradaicos. Porém, para reações com cinética de transferência eletrônica mais lenta, há um “atraso” da reação eletroquímica com relação a varredura de potencial, resultando, portanto, em um deslocamento do potencial de pico.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

Quanto a corrente de pico, a maior dispersão dos resultados das replicatas foi observada para LSV. No caso das técnicas pulsadas, o modo de aquisição da corrente faz com que a influência da corrente capacitiva seja minimizada e isso pode ter contribuído para a menor variabilidade entre as respostas das replicatas.¹⁶⁶ Visto que o pico obtido ao se utilizar SWV apresentou perfil mais alargado ($W_{1/2} = 0,100$ V) do que aquele obtido por DPV ($W_{1/2} = 0,081$ V) e que o potencial de pico para DPV foi mais próximo a zero, optou-se por continuar os estudos utilizando esta técnica voltamétrica para o desenvolvimento de um método de determinação de Cu^{2+} .

Na sequência, investigou-se a influência do processo de condicionamento do eletrodo na resposta obtida para a determinação do analito por DPV. Para isso, realizou-se uma varredura direta no sentido catódico, bem como a aplicação do potencial de condicionamento visando a redução dos íons cobre (II) previamente incorporados no eletrodo seguido da varredura de potencial no sentido anódico. Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 33.

FIGURA 33 - VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} UTILIZANDO ETAPA DE PRÉ-CONDICIONAMENTO, COM APLICAÇÃO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s , E VARREDURA DIRETA; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 5,0$), EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$)

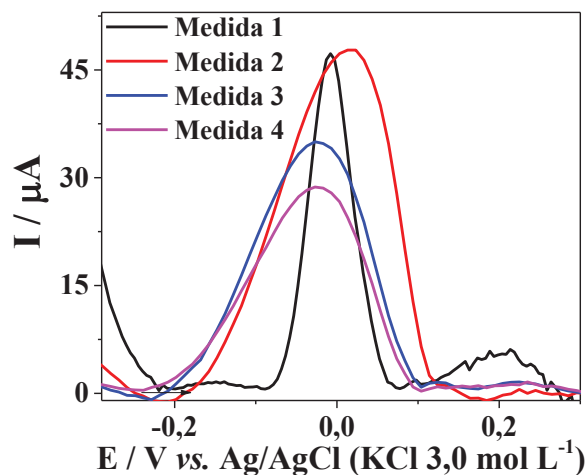


FONTE: A Autora (2021).

No caso da varredura direta, observou-se um pico correspondente a redução dos íons cobre previamente incorporados no eletrodo em $E_{pc} = -0,12 \text{ V}$. No caso da aplicação da etapa de condicionamento, tal qual descrito anteriormente, observou-se um pico de oxidação em $E_{pa} = 0,03 \text{ V}$. Assim, ambas as abordagens possibilitaram a determinação do analito. Entretanto, ao se utilizar a etapa de pré-condicionamento, o sinal obtido em termos de corrente de pico foi cerca de cinco vezes maior do que para a varredura direta. Ademais, na varredura direta, a largura de pico à meia altura ($W_{1/2} = 0,127 \text{ V}$) foi superior a obtida para o pico de oxidação ($W_{1/2} = 0,081$); isto indica que há menor susceptibilidade dos íons Cu^{2+} presentes em diferentes sítios de adsorção do biochar serem diretamente reduzidos, enquanto que ao se realizar o pré-condicionamento, as espécies ficam mais disponíveis para a reação redox na etapa de redissolução. Assim, optou-se pelo emprego deste procedimento na continuidade dos estudos.

Então, verificou-se se haveria efeito de memória do eletrodo, isto é, se espécies previamente incorporadas permaneceriam na superfície do mesmo após a realização de uma medida. Os voltamogramas para medidas sucessivas são apresentados na Figura 34.

FIGURA 34 - VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS PARA MEDIDAS SUCESSIVAS DE DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 5,0$), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; A SOLUÇÃO DE LEITURA DA CELA ELETROQUÍMICA FOI TROCADA ENTRE CADA MEDIDA

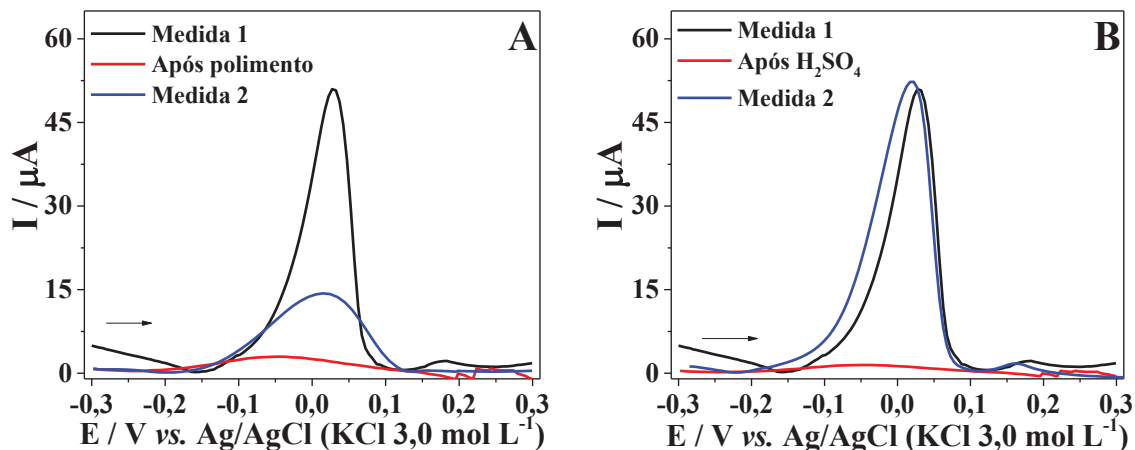


FONTE: A Autora (2022).

Observou-se que, após a realização da primeira medida, o eletrodo ainda manteve a espécie de interesse em sua superfície, visto que um sinal voltamétrico foi obtido na medida seguinte. Entretanto, o pico obtido na segunda medida, mesmo que de intensidade de corrente de pico similar à primeira medida, apresentou maior largura. Nas medidas seguintes, ainda era possível observar sinais voltamétricos, cujas larguras de pico também eram maiores que a da resposta obtida na primeira medida, mas com correntes de pico cada vez de menor intensidade. Isso é um indicativo de que ocorre a remoção parcial do analito da superfície eletródica conforme as medidas são realizadas. Porém, como uma parte da espécie ainda está presente, medidas imprecisas e inexatas podem ser obtidas em determinações posteriores, sendo necessário, portanto, estabelecer um procedimento que de fato remova todos os íons cobre (II) remanescentes do eletrodo.

Nesse sentido, duas abordagens de limpeza de eletrodo foram investigadas, utilizando polimento mecânico e limpeza em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 5 min. Os voltamogramas obtidos, para ambas as abordagens, são apresentados na Figura 35.

FIGURA 35 - VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS PARA MEDIDAS SUCESSIVAS DE DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} UTILIZANDO POLIMENTO MECÂNICO E LIMPEZA ÁCIDA DA SUPERFÍCIE ELETRÓDICA ENTRE AS MEDIDAS; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 5,0$), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; UM PROCEDIMENTO COMPLETO (PRÉ-CONCENTRAÇÃO + DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA) FOI REALIZADO PARA CADA MEDIDA DE DETERMINAÇÃO DO ANALITO



FONTE: A Autora (2022).

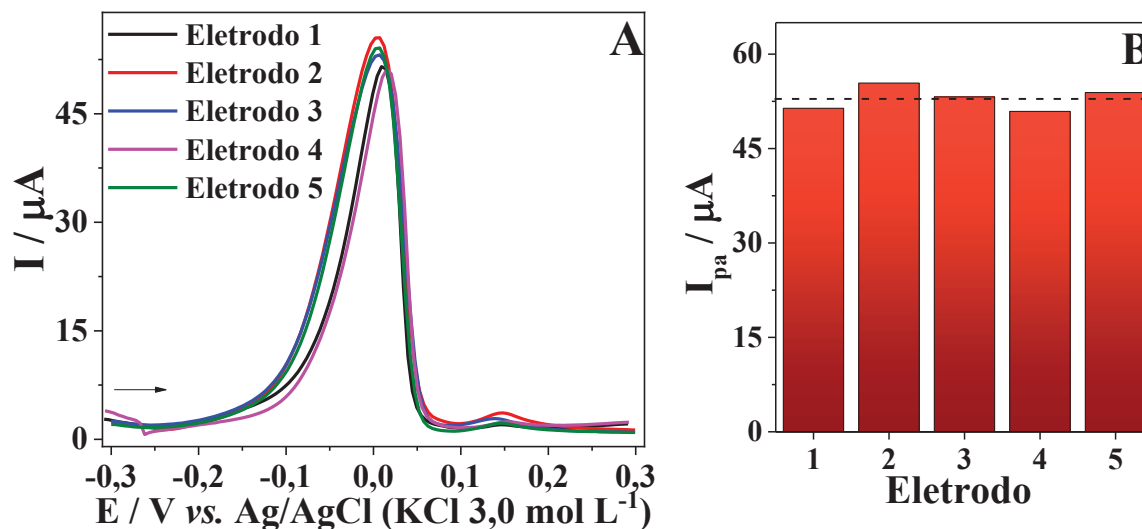
LEGENDA: (A) Polimento mecânico;
(B) Limpeza ácida.

Nos voltamogramas, pode-se observar que ao empregar a abordagem de polimento mecânico (Figura 35A), ocorreu a remoção dos íons remanescentes da superfície eletródica, visto que não se obteve um sinal voltamétrico na forma de pico na medida que sucedeu esse procedimento. Entretanto, na determinação seguinte, houve uma diminuição no sinal referente à oxidação dos íons cobre (II) em cerca de 70 %. Isto indica que parte do biochar pode ter sido removida do eletrodo, junto a camada superficial eliminada no polimento, e menos sítios ficaram disponíveis para interação com o analito. No caso da limpeza em solução ácida (Figura 35B), além da remoção dos íons remanescentes na superfície eletródica, para a medida seguinte, sinais voltamétricos com perfis e intensidades similares foram obtidos. Desta forma, possivelmente ocorreu a substituição dos íons Cu^{2+} ainda presentes no carbonáceo por íons H^+ , presentes na solução de limpeza em uma concentração mais elevada que a espécie de interesse,⁵⁴ sem prejuízos ao número de sítios de interação disponíveis. Logo, a abordagem de limpeza química com H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi considerada mais adequada, frente ao polimento mecânico, visto que não resultou em prejuízos às determinações posteriores utilizando o mesmo eletrodo.

Por fim, verificou-se a variabilidade da resposta obtida para a determinação do analito utilizando eletrodos diferentes. Conforme pode ser observado nos voltamogramas da Figura 36, as medidas realizadas com os eletrodos diferentes forneceram perfis voltamétricos similares. A corrente de pico anódico teve o valor de $53 \pm 1,8 \mu\text{A}$, de modo que o desvio

padrão relativo (RSD%) foi igual a 3,40 %. Considerando que os eletrodos foram preparados manualmente, por meio da homogeneização dos componentes da pasta de carbono, o valor foi considerado adequado.

FIGURA 36 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVO DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDOS AO UTILIZAR DIFERENTES ELETRODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$)



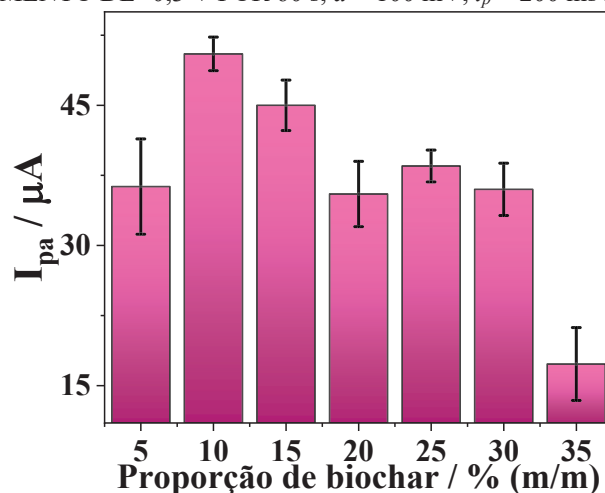
FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial;
(B) Comparativo de corrente de pico anódico.

4.2.3 Influência da Composição da Pasta de Carbono na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}

De modo a investigar a influência da proporção de biochar na pasta de carbono sobre a resposta voltamétrica na determinação de Cu^{2+} , construíram-se eletrodos de trabalho contendo diferentes porcentagens do material, variando de 5 a 35% (m/m). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 37.

FIGURA 37 – INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO DE BIOCHAR COMO MODIFICADOR DE PASTA DE CARBONO VISANDO A DETERMINAÇÃO DE ÍONS $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$



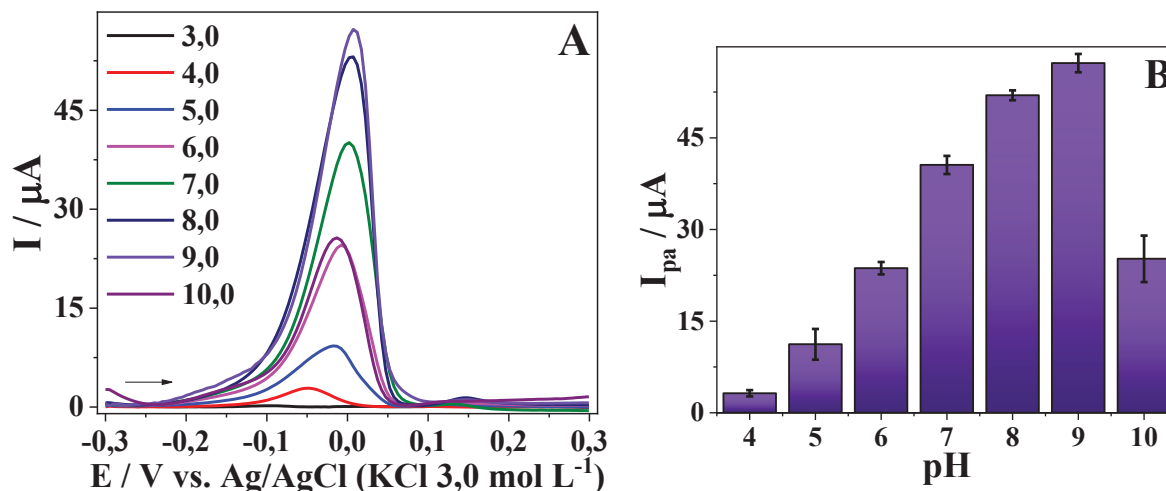
FONTE: A Autora (2021).

Maiores valores de intensidade de corrente de pico foram obtidos para a proporção de biochar de 10 %. Para proporções maiores, ocorreu diminuição da resposta. Conforme discutido anteriormente, o biochar utilizado (BCA400) contém uma quantidade considerável de grupos superficiais que favorecem a pré-concentração da espécie de interesse. Entretanto, quando a pirólise é realizada em temperaturas inferiores a $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a carbonização da biomassa é parcial, ou seja, o biochar é constituído em grande parte por carbono amorfo, não possuindo condutividade elétrica.^{1,23} Esta característica interfere na etapa de determinação voltamétrica, resultando no decréscimo dos valores de I_{pa} medidos como resposta. Desta forma, a proporção de 10 % de biochar foi adotada para a continuidade dos estudos, pois propiciou a interação do analito com a superfície eletródica, via os grupos funcionais do carbonáceo, sem que ocorresse perdas da condutividade do eletrodo e, por consequência, da intensidade da corrente de pico.

4.2.4 Influência da Solução de Pré-Concentração na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}

Para avaliar a solução de pré-concentração e o potencial hidrogeniônico (pH) que favoreceria o acúmulo de íons Cu^{2+} na superfície eletródica, para posterior determinação voltamétrica, empregaram-se dois meios: acetato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (variação de pH entre 3,0 e 7,0) e acetato de amônio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (variação de pH entre 8,0 e 10,0). Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para cada condição investigada, bem como os resultados da média da corrente de pico, são apresentados na Figura 38.

FIGURA 38 - ESTUDO DA SOLUÇÃO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; TEMPO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 5,0$), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A Autora (2021).

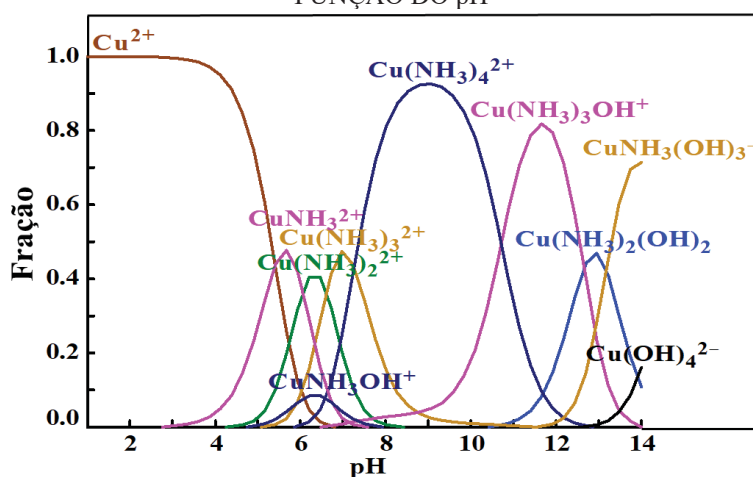
LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes valores de pH pré-concentração;
(B) Resposta média de intensidade de corrente de pico para cada valor de pH investigado.

Na primeira condição empregada (acetato de sódio), observou-se que não houve resposta faradaica após a pré-concentração do analito em $\text{pH} = 3,0$. A partir de $\text{pH} = 4,0$, houve aumento da média da intensidade da corrente de pico de oxidação, conforme se aumentou o pH da solução, atingindo o máximo em $\text{pH} = 7,0$. Sabe-se que para valores de pH superiores a $7,0$, os íons Cu^{2+} começam a hidrolisar, formando o precipitado de hidróxido de cobre (II) ($\text{Cu}(\text{OH})_2$, $K_{ps} = 4,8 \times 10^{-20}$),¹⁶⁹⁻¹⁷⁰ e isso acaba diminuindo a quantidade de íons Cu^{2+} disponível para a pré-concentração no carbonáceo. Entretanto, em meio alcalino, pode-se favorecer a desprotonação dos grupos superficiais do biochar, levando ao aumento do número de sítios carregados negativamente, promovendo, assim, a pré-concentração de espécies positivamente carregadas, tal qual o analito em questão. Dessa forma, fez-se necessário buscar uma condição na qual o processo pudesse ser estudado em valores mais elevados de pH. Por essa razão, utilizou-se a solução de acetato de amônio nas investigações realizadas em valores de pH superiores a $7,0$, já que, nesse caso, ocorre a complexação dos íons cobre (II) pela amônia, formando complexos solúveis.¹⁷¹ Para os valores de pH estudados nessa solução, observou-se novamente um aumento nos valores de corrente pico com o aumento do pH, sendo atingido o valor mais elevado, dentre as condições testadas, para $\text{pH} = 9,0$, seguido de uma diminuição para $\text{pH} = 10,0$.

No gráfico de distribuição de espécies de Cu^{2+} em solução amoniacal, em função do pH (Figura 39), obtido com o *software Hydra Medusa*, observa-se que até $\text{pH} = 4,0$ há

predominância do íon Cu^{2+} livre e, após esse valor, a fração dessa espécie começa a diminuir, passando a coexistir uma mistura de complexos: $\text{Cu}(\text{NH}_3)^{2+}$, $\text{Cu}(\text{NH}_3)_3^{2+}$, $\text{Cu}(\text{NH}_3)_2^{2+}$, CuNH_3OH^+ e $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$, sendo esta última a principal espécie presente no $\text{pH} = 9,0$. Para valores superiores de pH , a fração de $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ diminui e passam a predominar as espécies provenientes da hidrólise do complexo: $\text{Cu}(\text{NH}_3)_3\text{OH}^+$, $\text{Cu}(\text{NH}_3)_2(\text{OH})_2$, $\text{Cu}(\text{NH}_3)(\text{OH})_3^-$ e $\text{Cu}(\text{OH})_4^{2-}$.

FIGURA 39 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE COBRE (II) EM SOLUÇÃO AMONICAL EM FUNÇÃO DO pH



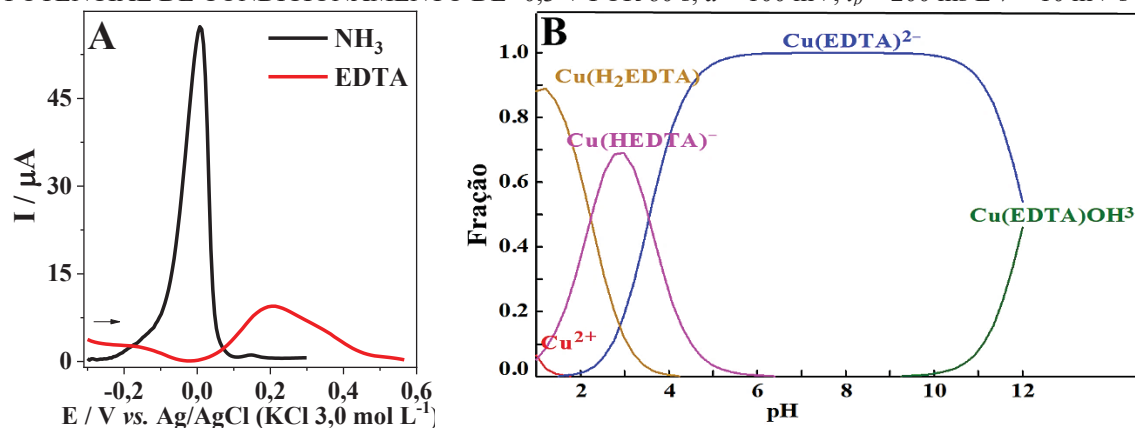
FONTE: A Autora (2021).

A obtenção de uma média de corrente de pico mais elevada para $\text{pH} = 9,0$ pode estar relacionada com o maior grau de desprotonação da superfície do biochar, que, conforme discutido anteriormente, pode levar a formação de sítios negativamente carregados, que, por sua vez, favorecem a atração de espécies com carga positiva, tal qual o complexo tetramincobre (II) ($\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$). Em valores de pH superiores a esse, visto que há hidrólise do complexo, formam-se espécies de menor carga, neutras ou carregadas negativamente e, por isso, a atração não é tão favorecida, o que pode ter acarretado na diminuição do sinal voltamétrico.⁵⁴

De modo a corroborar a hipótese da atração eletrostática entre o complexo positivamente carregado, neste caso $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$, e os sítios negativamente carregados do biochar, investigou-se o processo de pré-concentração em $\text{pH} = 9,0$ via formação de um complexo metálico aniônico. Para tal, utilizou-se EDTA como ligante. Conforme apresentado nos voltamogramas da Figura 40A, um sinal voltamétrico para a determinação de Cu^{2+} foi observado quando se utilizou EDTA no meio de pré-concentração; entretanto, ocorreu deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos, além de diminuição

acentuada da intensidade da corrente de pico, em cerca de 83 %, quando comparado a utilização da solução de pré-concentração contendo NH_3 .

FIGURA 40 - ESTUDO DO LIGANTE DA SOLUÇÃO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; TEMPO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 5,0$), EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para solução de pré-concentração contendo diferentes ligantes;

(B) Distribuição das espécies de cobre (II) na presença de EDTA em função do pH.

No diagrama de distribuição das espécies formadas entre Cu^{2+} e EDTA em função do pH, observa-se que há predomínio da espécie Cu(EDTA)^{2-} em $\text{pH} = 9,0$, ou seja, uma espécie negativamente carregada. A obtenção de um valor menos intenso como resposta na determinação voltamétrica pode ter ocorrido devido a repulsão eletrostática com os sítios negativamente carregados do biochar presentes na superfície eletródica, que desfavoreceu o processo de pré-concentração do analito. Assim, ainda que outros mecanismos de interação entre o analito e o biochar possam estar ocorrendo, verificou-se que a interação eletrostática desempenha influência considerável na pré-concentração espontânea.

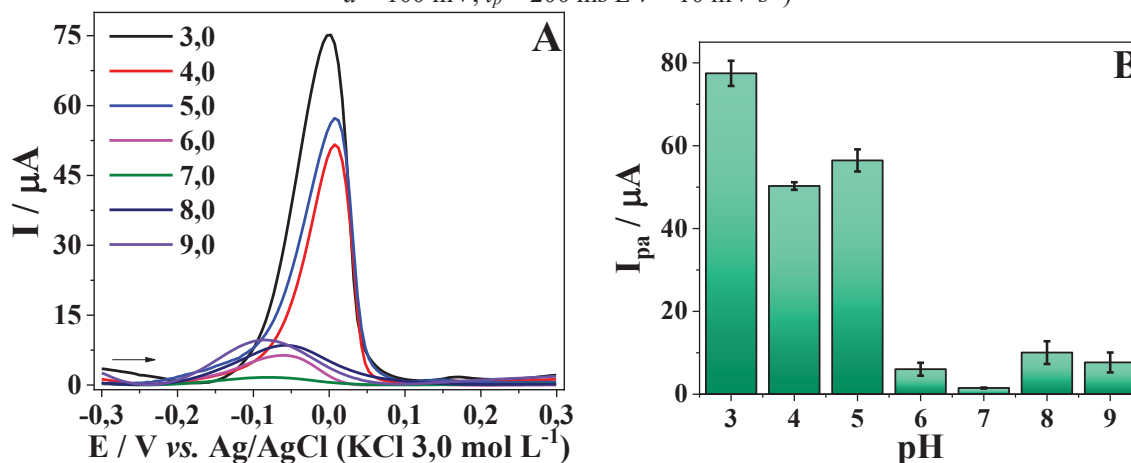
Desta forma, considerando o favorecimento da interação do analito com a superfície eletródica devido aos motivos acima discutidos, para a etapa de pré-concentração de Cu^{2+} , definiu-se meio de acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com $\text{pH} = 9,0$.

4.2.5 Influência da Solução de Leitura na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}

A influência do pH da solução de leitura, utilizada na etapa de redissolução, na resposta voltamétrica foi avaliada na sequência. Os resultados (Figura 41) mostraram que, de modo geral, ao se utilizar a solução de acetato de sódio como eletrólito suporte, houve

diminuição na intensidade de corrente de pico com o aumento do pH; no caso da utilização do acetato de amônio, a resposta para pH = 8,0 foi ligeiramente mais intensa do que a obtida para pH = 9,0, porém ambas ainda foram inferiores às aquelas obtidas para os menores valores de pH.

FIGURA 41 - ESTUDO DA SOLUÇÃO DE LEITURA NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$)

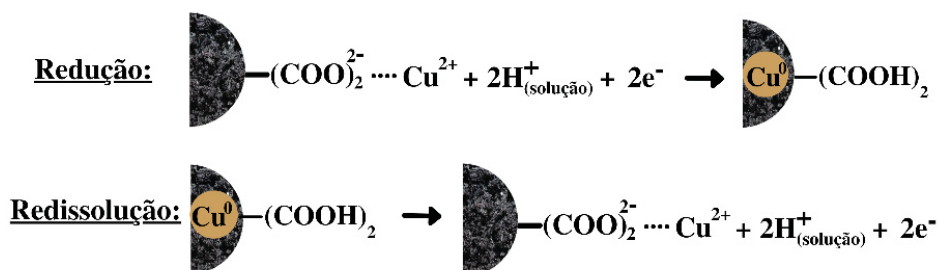


FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes valores de pH de leitura;
(B) Resposta média de intensidade de corrente de pico para cada valor de pH investigado.

Essa tendência sugere o envolvimento dos íons H^+ nos processos de redução eletroquímica e redissolução anódica. Na literatura, diversos mecanismos de interação entre o cobre e superfícies carbonáceas ativadas são propostos. Considerando a presença de grupamentos funcionais oxigenados nesses materiais, tais quais grupamentos carboxila, por exemplo, e o favorecimento dos processos em meio ácido, infere-se a possível ocorrência das reações representadas esquematicamente na Figura 42.

FIGURA 42 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS POSSÍVEIS REAÇÕES QUE OCORREM NAS ETAPAS DE REDUÇÃO E REDISSOLUÇÃO NA DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE Cu^{2+}

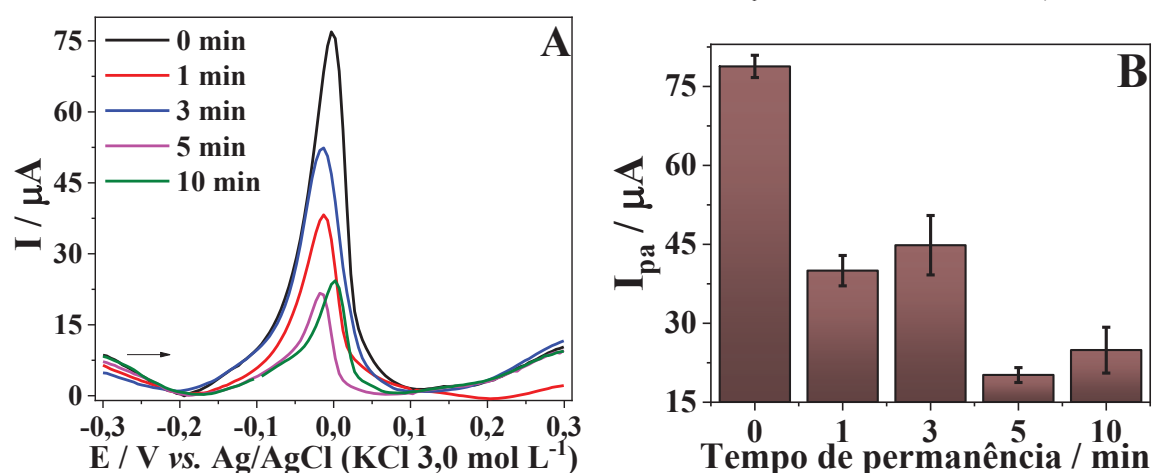


FONTE: A Autora (2021).

Deste modo, na etapa de redução, os íons cobre interagindo com os grupos superficiais, ao serem reduzidos, formam Cu^0 que passa à superfície do eletrodo, enquanto os íons H^+ presentes na solução substituem o íon metálico e ligam-se aos grupamentos funcionais. Por sua vez, na etapa de redissolução anódica, o Cu^0 é oxidado a Cu^{2+} , o qual novamente volta a interagir com os grupos funcionais, enquanto os íons H^+ retornam à solução.^{172,173} Assim, a maior quantidade de íons H^+ no $\text{pH} = 3,0$ favorece a ocorrência da etapa de redução eletroquímica, fazendo com que mais espécies estejam disponíveis para serem oxidadas no procedimento sequencial de oxidação, o que, por sua vez, leva a obtenção de valores de corrente de pico mais elevados. Valores mais baixos de pH não foram investigados porque durante a experimentação se observou desprendimento do material da pasta de carbono modificada na solução de medida, o que poderia comprometer os resultados da análise. Por isso, o valor de pH de 3,0 foi utilizado para a continuidade dos estudos.

Nos estudos de limpeza da superfície eletródica, verificou-se que o contato com uma solução ácida (H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) levava a remoção dos íons cobre (II) da superfície do eletrodo. Visto que o eletrólito suporte selecionado para ser utilizado também era de caráter ácido, investigou-se a influência do tempo de permanência do eletrodo na cela eletroquímica previamente ao início das etapas de condicionamento e varredura voltamétrica. Os resultados são apresentados na Figura 43.

FIGURA 43 - ESTUDO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA DO ELETRODO NA CELA VOLTAMÉTRICA NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 3,0$) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$)



FONTE: A Autora (2022).

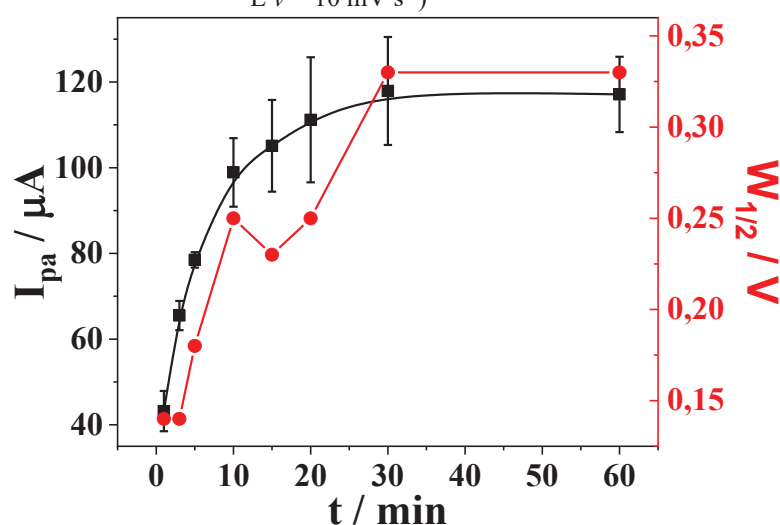
LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes tempos de permanência do eletrodo na cela eletroquímica antes do início da medida; (B) Resposta média de intensidade de corrente de pico para cada tempo de permanência investigado.

Observou-se uma diminuição na resposta voltamétrica conforme se aumentou o tempo de permanência do eletrodo na cela eletroquímica. Assim como discutido para o procedimento de limpeza do eletrodo, possivelmente, nessa condição de meio ácido, ocorre substituição dos íons Cu^{2+} presentes na superfície eletródica por íons H^+ presentes no eletrólito suporte em uma concentração mais elevada do que o analito.⁵⁴ Deste modo, há uma menor quantidade da espécie de interesse na superfície eletródica disponível para ser reduzida e posteriormente oxidada na etapa de redissolução. Para evitar inconsistências nas respostas obtidas a partir do emprego desta solução de leitura, deu-se início às medidas referentes a etapa de determinação (condicionamento e varredura voltamétrica) logo após a inserção do eletrodo na cela eletroquímica na continuidade dos estudos.

4.2.6 Influência do Tempo de Pré-Concentração na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}

Outro fator importante na determinação dos íons Cu^{2+} pelo procedimento proposto é o tempo que o eletrodo é submetido à etapa de pré-concentração. Para verificar a influência dessa variável, tempos de 1 a 60 min foram investigados utilizando uma solução contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu^{2+} . Os resultados são apresentados na Figura 44.

FIGURA 44 - INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO E LARGURA DE PICO A MEIA ALTURA OBTIDOS PARA A INVESTIGAÇÃO DE DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s , $\alpha = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ $E v = 10 \text{ mV s}^{-1}$)



FONTE: A Autora (2021).

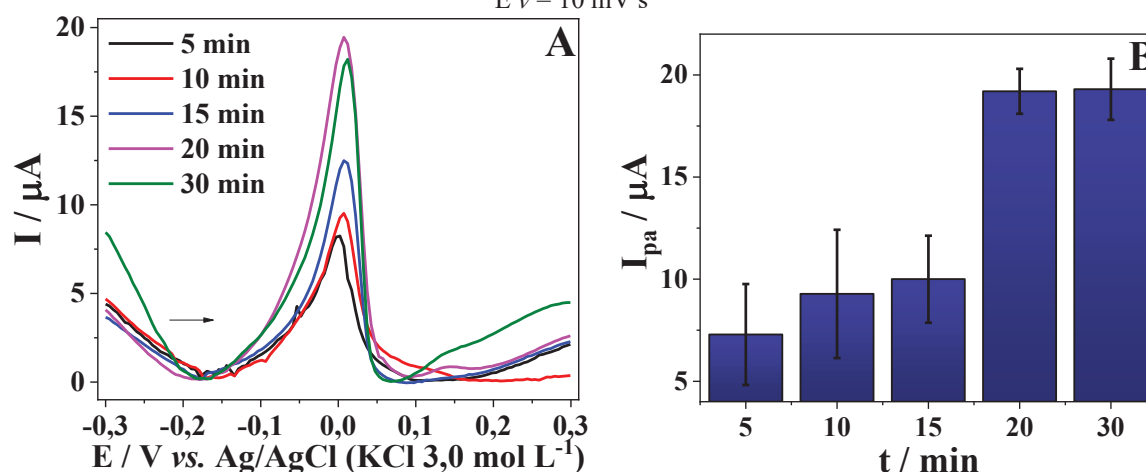
Observou-se uma tendência de aumento da intensidade da corrente de pico em função do tempo de pré-concentração, indicando que quanto maior for esse tempo, maior a

quantidade de analito adsorvido na superfície do eletrodo. Há um aumento acentuado na intensidade da corrente de pico até o tempo de 10 min e, após esse valor, este aumento é menor, e depois de 30 minutos é verificada uma estabilização do sinal sugerindo uma condição de equilíbrio entre a adsorção e a dessorção do analito na superfície do eletrodo.

Mesmo que o valor de média da intensidade de corrente de pico mais elevado tenha sido obtido para o tempo de 10 min, optou-se por realizar os estudos seguintes utilizando um tempo de 5 min. Isto se deu devido a obtenção, no segundo caso, de resultados mais precisos entre si, considerando a análise em triplicata (desvios-padrão relativos de $\pm 2,3\%$ para o tempo de 5 min e de $\pm 8,1\%$ para o tempo de 10 min). Além disso, observou-se, no geral, uma tendência de aumento da largura do pico à meia altura ($W_{1/2}$) para tempos de concentração maiores, o que pode implicar na diminuição da seletividade devido, por exemplo, a sobreposição de picos de outras espécies eventualmente presentes no meio de análise. Desta forma, as características em termos de largura de pico, menor dispersão de resposta e corrente de pico suficientemente elevada fizeram com que o tempo de 5 min fosse utilizado nos estudos posteriores, considerando a concentração de analito de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Investigou-se, ainda, a resposta voltamétrica na determinação de uma concentração mais baixa do analito ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), em função de diferentes valores de tempo de pré-concentração (5, 10, 15, 20 e 30 min). Os resultados são apresentados na Figura 45.

FIGURA 45 - INVESTIGAÇÃO DE DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 3,0$) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s , $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$
 $E v = 10 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A Autora (2021).

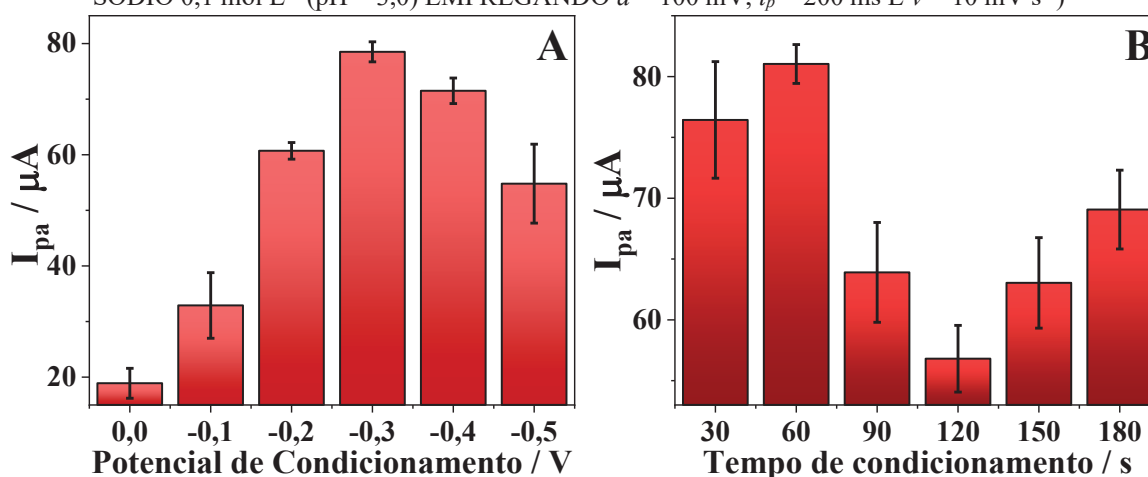
LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes tempos de pré-concentração;
 (B) Resposta média de intensidade de corrente de pico para cada valor de tempo investigado.

Neste caso, observou-se um aumento na intensidade da corrente de pico para maiores tempos de pré-concentração e obtenção de resposta de mesma magnitude para 20 e 30 min. É importante ressaltar que o tempo de pré-concentração pode modular a faixa de resposta do sensor e, desta forma, considerou-se o tempo de 20 minutos adequado para determinação de concentrações de Cu^{2+} mais baixas, isto é, na ordem de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.2.7 Influência do Potencial e do Tempo de Condicionamento na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}

Previamente a determinação voltamétrica, uma etapa de condicionamento com a finalidade de reduzir os íons Cu^{2+} pré-concentrados no eletrodo modificado foi realizada, por meio da aplicação de um potencial durante determinado período de tempo. A influência desse potencial sobre a corrente de pico obtida na etapa da determinação foi avaliada, sendo investigados valores de 0,0 a -0,5 V. Os resultados de média de corrente de pico obtidos para cada condição são apresentados na Figura 46A.

FIGURA 46 – INFLUÊNCIA DO POTENCIAL E DO TEMPO DE CONDICIONAMENTO NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$)



FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: (A) Potencial de condicionamento;
(B) Tempo de condicionamento.

De modo geral, observou-se uma tendência de aumento da corrente de pico conforme o potencial de redução ficou mais negativo, entre 0,0 e -0,3 V. Isto é um indicativo de que com a diminuição do valor do potencial e a maior polarização negativa do eletrodo, a redução dos íons Cu^{2+} na superfície eletródica ocorre com maior eficiência, o que posteriormente permite a oxidação de maior quantidade do analito. Para potenciais mais

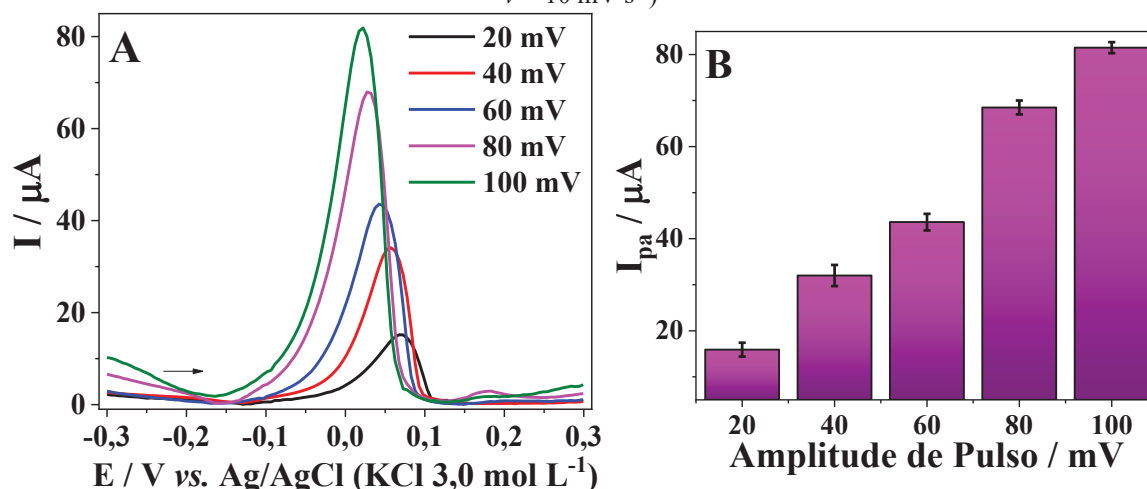
negativos, a magnitude da resposta diminuiu, o que pode ter ocorrido pela redução concomitante de outras espécies presentes no meio, desfavorecendo a reação redox do analito. Assim, seguiu-se utilizando o potencial de condicionamento de -0,3 V.

Na sequência, avaliou-se o tempo de aplicação do potencial de redução, investigando valores de 30 a 180 s (Figura 46B). Verificou-se que o tempo de 60 s possibilitou a obtenção da maior média de intensidade de corrente de pico, com menor dispersão dos resultados das replicatas, se comparado ao tempo de 30 s, por exemplo. Para os tempos maiores, ocorreu diminuição da resposta obtida, o que pode estar relacionado com a substituição do analito pelos íons H^+ do eletrólito, conforme o eletrodo passa mais tempo na cela eletroquímica. Desta forma, o tempo de aplicação de potencial de redução de 60 s foi utilizado para a continuidade do trabalho.

4.2.8 Influência dos Parâmetros Instrumentais da Voltametria de Pulso Diferencial na Determinação Voltamétrica de Cu^{2+}

A influência dos parâmetros da técnica de voltametria de pulso diferencial no perfil voltamétrico foi investigada. Inicialmente, realizou-se a variação da amplitude do pulso diferencial, estudando os valores de 20 a 100 mV. As respostas obtidas para cada condição são apresentadas na Figura 47.

FIGURA 47 - ESTUDO DA AMPLITUDE DO PULSO DIFERENCIAL PARA A DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE -0,3 V POR 60 s, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A Autora (2021).

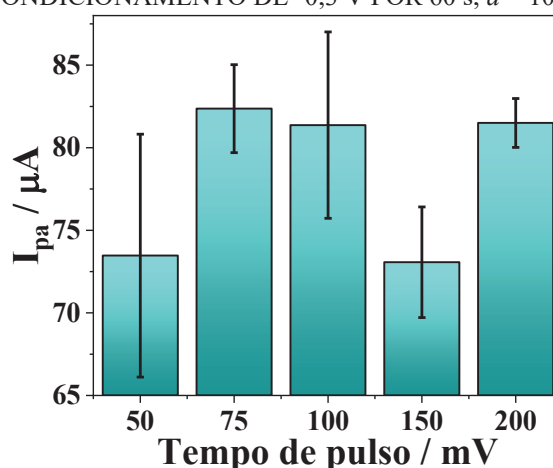
LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes valores de amplitude;

(B) Corrente de pico média obtida para cada valor de amplitude.

Nota-se uma tendência linear de aumento da intensidade da corrente de pico e um deslocamento do potencial de pico para valores mais negativos à medida que o valor da amplitude do pulso é aumentado. Isto pode estar ocorrendo, pois, quanto maior a amplitude de pulso, maior a diferença de potencial entre os valores antes e após a aplicação do pulso, fazendo com que a taxa de oxidação das espécies seja elevada e a diferença entre os valores de corrente amostrados maior.¹⁶⁶ Visto que o valor de I_{pa} mais elevado foi obtido para a amplitude de 100 mV, este foi utilizado nos experimentos posteriores. Valores superiores a este não foram investigados para evitar a obtenção de perfis voltamétricos com picos alargados, pois conforme observado, há um maior valor de largura de pico com o aumento da amplitude de pulso.

O tempo de pulso foi investigado na faixa de 50 a 200 ms, e os resultados da média da corrente de pico de oxidação apresentados na Figura 48. Observou-se que as respostas obtidas para as diferentes condições investigadas foram similares. Optou-se, então, por continuar os experimentos utilizando o tempo de pulso de 200 ms, visto que nessa situação há uma diminuição do efeito da corrente capacitiva no sistema.¹⁶⁶

FIGURA 48 - ESTUDO DO TEMPO DE PULSO NA DETERMINAÇÃO DE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} ; PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$)



FONTE: A Autora (2021).

Desta forma, os parâmetros referentes às condições experimentais foram avaliados, apresentando-se na Tabela 5 um resumo dos valores avaliados e otimizados.

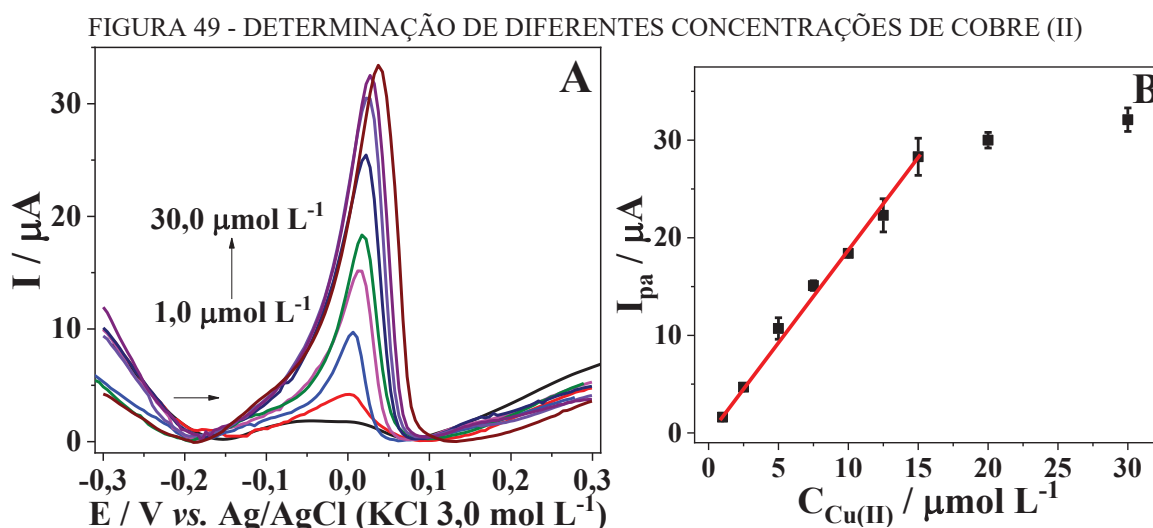
TABELA 5 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS AVALIADAS E OTIMIZADAS PARA OS PARÂMETROS RELACIONADOS À DETERMINAÇÃO DE Cu^{2+}

Estudo	Avaliado	Otimizado
% de biochar (m/m)	5 – 35	10
pH da solução de pré-concentração	3,0 – 10,0	9,0
Tempo de pré-concentração (min)	1 – 60 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$)	5
	5 – 30 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$)	20
pH da solução de leitura	3,0 – 9,0	3,0
Potencial de condicionamento (V)	-0,5 – 0,0	-0,3
Tempo de condicionamento (s)	30 – 180	60
Amplitude de pulso (mV)	20 – 100	100
Tempo de pulso (ms)	50 – 200	200

FONTE: A Autora (2021).

4.2.9 Estimativa dos Parâmetros de Validação para a Determinação Voltamétrica de Cu^{2+} em Água de Torneira

Uma vez definidas as melhores condições experimentais, investigou-se a resposta de diferentes concentrações de Cu^{2+} . Os voltamogramas e a curva de calibração, relacionando a resposta em termos de corrente de pico anódico obtida para cada concentração investigada podem ser visualizados na Figura 49.



FONTE: A Autora (2021).

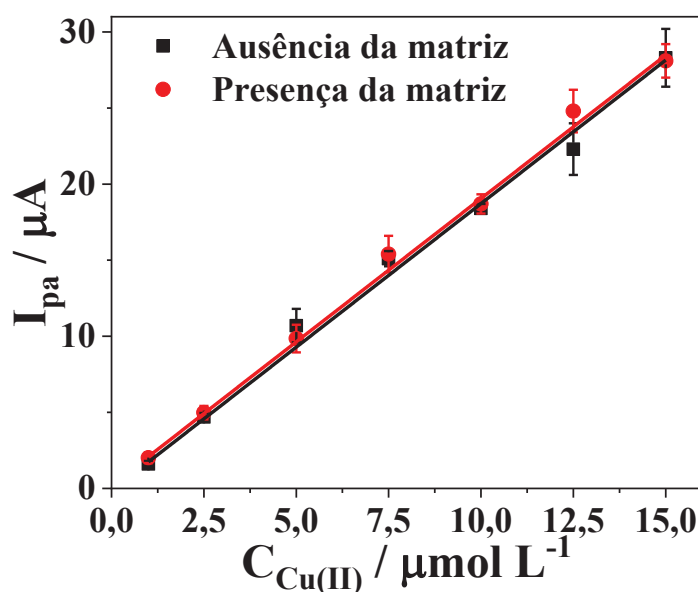
LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial;
(B) Curva de calibração.

Observou-se um aumento da intensidade da corrente de pico de oxidação conforme a concentração de cobre aumentou. Esse aumento apresenta uma possível correlação linear com a concentração do analito na faixa de trabalho entre $1,0$ e $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, valor após o

qual ocorre certa estabilização do valor obtido como resposta. Esse comportamento é um indicativo da saturação dos sítios disponíveis para a interação analito-biochar na etapa de pré-concentração. Desta forma, a linearidade foi investigada adotando como limite superior da faixa de trabalho o valor de $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Inicialmente, verificou-se se haveria efeito de matriz na faixa de trabalho entre 1,0 e $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para isso, a amostra de água de torneira foi fortificada e então diluída na solução de pré-concentração na proporção 1:4 (v/v), de modo a se obter os mesmos níveis de concentração utilizados na construção da curva de calibração na ausência da matriz. Realizou-se o procedimento de pré-concentração e determinação voltamétrica e o comparativo dos resultados obtidos para cada concentração, com aqueles obtidos na ausência na matriz, são apresentados na Figura 50.

FIGURA 50 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO CONSTRUÍDAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA MATRIZ DE ÁGUA DE TORNEIRA



FONTE: A Autora (2021).

Visualmente, é possível observar um paralelismo aproximado entre as curvas e este aspecto é confirmado quando as inclinações são comparadas, considerando a média obtida para cada uma delas: $1,83 \pm 0,05_6$ e $1,88 \pm 0,03_4$ na ausência e na presença da matriz, respectivamente. Realizou-se um teste-*t* de comparação de médias para as inclinações e, nele, o valor de $t_{\text{calculado}} = 1,38$ foi inferior ao valor de $t_{\text{crítico}}(0,05;3) = 3,182$ e o valor de p ($p = 0,260$) foi superior à 0,05. Deste modo, as inclinações podem ser consideradas estatisticamente iguais e, portanto, o efeito de matriz não é significativo, de modo que as estimativas de linearidade, precisão e exatidão podem ser realizadas a partir da curva construída na ausência da amostra.¹³⁴

Então, a homogeneidade das variâncias foi verificada por meio do teste de Cochran, no nível de confiança de 95%. Nele, o valor de $C_{observado} = 0,318$ foi inferior ao valor de $C_{crítico(3;7;0,05)} = 0,561$, de modo que a hipótese de homogeneidade das variâncias pode ser aceita e a regressão linear realizada utilizando o método dos mínimos quadrados,^{43,134} sendo os dados obtidos apresentados na Tabela 6.

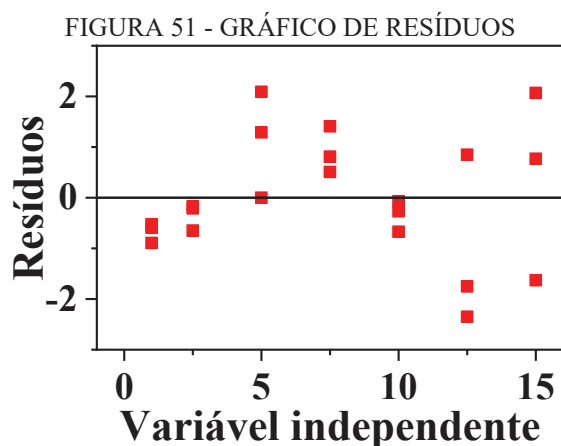
TABELA 6- REGRESSÃO LINEAR PARA A CURVA ANALÍTICA DA DETERMINAÇÃO DE Cu^{2+}

Faixa linear de trabalho ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				1,0 – 15,0	
Regressão ^a		Falta de ajuste ^b		r	R^2 (%)
$F_{regressão}$	p	$F_{falta\ de\ ajuste}$	p		
1090,57	0,000	2,17	0,116	0,991	98,20

^a $F_{crítico(0,05;1;19)} = 4,38$; ^b $F_{crítico(0,05;5;14)} = 2,96$

FONTE: A Autora (2021).

A análise do coeficiente de correlação (r), cujo valor foi próximo a 1, indicou uma possível relação linear entre a concentração de Cu^{2+} e a corrente de pico anódico. Por sua vez, o coeficiente de determinação (R^2) mostrou que 98,20% da variação nos dados pode ser explicada pelo modelo linear. Além disso, observou-se que o valor de $F_{regressão}$ foi superior ao valor de $F_{crítico}$, enquanto o valor de $F_{falta\ de\ ajuste}$ foi inferior ao valor correspondente de $F_{crítico}$, o que demonstra, respectivamente, que a regressão é significativa, enquanto a falta de ajuste não é. Realizou-se, ainda, a análise dos resíduos (Figura 51), sendo observado uma distribuição aleatória dos mesmos em torno do zero, indicando que não há tendências na distribuição da variância dos dados.^{43,134}



FONTE: A Autora (2021).

Essas estimativas permitiram estabelecer a faixa de trabalho linear na região entre 1,0 e 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, de modo que a correlação entre concentração e corrente de pico pode ser matematicamente descrita pela Equação 9.

$$I_p(\mu A) = 0,451 + 1,832 C_{Cu(II)}(\mu mol L^{-1}) \quad (\text{Equação 9})$$

Na sequência, o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram estimados, utilizando o valor de coeficiente angular obtido da equação da reta ($b = 1,832 \mu A \mu mol^{-1} L$) e o desvio-padrão do primeiro ponto utilizado na construção da curva analítica ($s = 0,20 \mu A$). Deste modo, obteve-se $LOD = 0,36 \mu mol L^{-1}$ ($22,9 \mu g L^{-1}$) e $LOQ = 1,09 \mu mol L^{-1}$ ($69,3 \mu g L^{-1}$). O valor inferior, no caso do LOD, e a proximidade do valor do LOQ, se comparados ao valor do primeiro nível de concentração utilizado na construção da curva analítica, indicam que os íons Cu^{2+} podem ser detectados e quantificados na faixa de trabalho adotada.

Na literatura, para a determinação voltamétrica de Cu^{2+} em água de torneira utilizando eletrodos de pasta de carbono modificados, encontram-se valores de LOD que variam de $8,26$ a $710 \mu g L^{-1}$ e valores de LOQ iguais a $31,87$ e $50,66 \mu g L^{-1}$, conforme pode ser visualizado na Tabela 7. Assim, os valores encontrados neste trabalho encontram-se dentro da faixa daqueles reportados. Reitera-se, ainda, que os valores de LOD e LOQ encontrados neste estudo são adequados para a finalidade pretendida: a legislação brasileira estabelece o valor de $2000 \mu g L^{-1}$ como limite máximo de cobre em águas para consumo humano; considerando o procedimento adotado de diluição 1:4 (v/v) (amostra: solução de pré-concentração), a concentração diluída na etapa de pré-concentração seria de $500 \mu g L^{-1}$ ($7,87 \mu mol L^{-1}$). Este valor é superior ao LOD e ao LOQ, de modo que pode ser detectado e quantificado considerando a faixa de trabalho linear obtida ($1,0 - 15,0 \mu mol L^{-1}$).

TABELA 7 - DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE Cu^{2+} EM ÁGUA DE TORNEIRA UTILIZANDO ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO MODIFICADOS

Eletrodo	Técnica	LOD ($\mu g L^{-1}$)	LOQ ($\mu g L^{-1}$)	Ref.
CPE + 2-mercaptobenzotiazol	SWASV	710	---	174
CPE + poliuretano/PtNPs	CV	16,72	50,66	175
CPE + casca de semente de cereja	SWASV	9,56	31,87	176
CPE + borla de milho	SWV	8,26	---	177
CPE + biochar	DPASV	22,9	69,3	Este trabalho

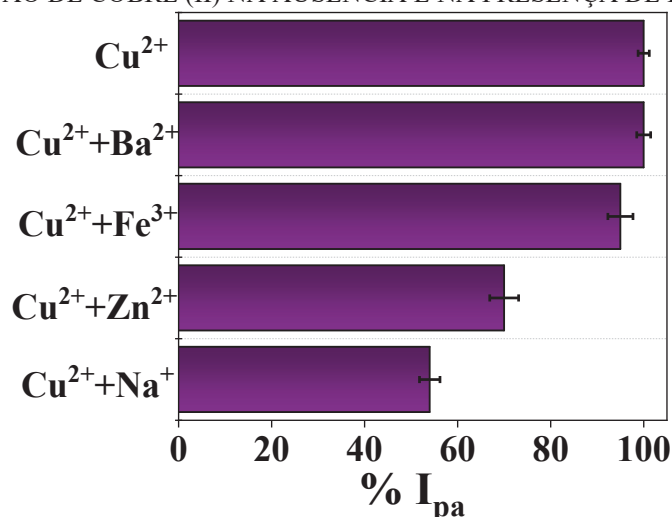
CPE: eletrodo de pasta de carbono (do inglês, *carbon paste electrode*); CV: voltametria cíclica (do inglês, *cyclic voltammetry*); DPASV: voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial (do inglês, *differential pulse anodic stripping voltammetry*); NPs: nanopartículas; SWV: voltametria de onda quadrada (do inglês, *square wave voltammetry*); SWASV: voltametria de redissolução anódica com onda quadrada (do inglês, *square wave anodic stripping voltammetry*)

FONTE: A Autora (2021).

Investigou-se também a influência de espécies catiônicas que podem ser encontradas em água de torneira sobre a resposta do cobre, visto que as mesmas também podem interagir com os grupos funcionais do biochar. Para isso, considerou-se as

concentrações máximas permitidas pela legislação tanto para o analito quanto para as demais espécies. Os resultados, em termos de corrente de pico relativa, obtidos na ausência e na presença das espécies interferentes, podem ser visualizados na Figura 52.

FIGURA 52 - COMPARAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO RELATIVA PARA A DETERMINAÇÃO DE COBRE (II) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE INTERFERENTES



FONTE: A Autora (2022).

Não se observou decréscimo da corrente de pico relativa, referente à determinação de cobre, na presença de Ba^{2+} , enquanto que na presença de Fe^{3+} ocorreu uma diminuição de aproximadamente 5% na intensidade média de I_{pa} . Esse comportamento pode estar relacionado com a concentração inferior dessas espécies no meio, em relação à espécie de interesse, de modo que há uma interação preferencial do analito com os grupos funcionais do biochar.

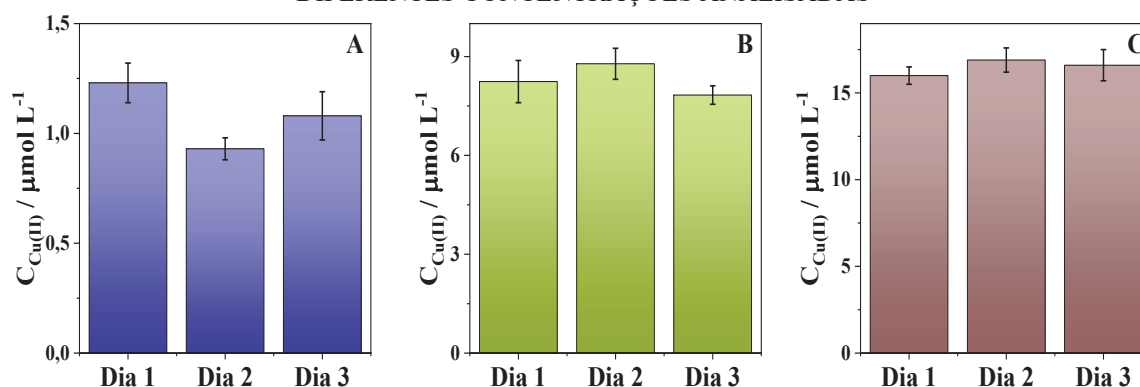
Por outro lado, na presença de Zn^{2+} , verificou-se uma intensidade de corrente de pico relativa de cerca de 70%. Considerando as condições do meio de pré-concentração (solução de acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$), também há coordenação das espécies NH_3 ao Zn^{2+} , predominando o complexo $[\text{Zn}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$. Mesmo que o valor da constante de formação do $[\text{Zn}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ ($K_f = 4,1 \times 10^8$) seja inferior à do $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ ($K_f = 1,1 \times 10^{13}$),¹⁷⁸ este interferente estava presente no meio em uma concentração 2,5 vezes maior que a espécie de interesse, de modo que pode ter interagido com os grupos do biochar, levando a uma interação em menor extensão dos íons cobre com o material, o que refletiu, posteriormente, na determinação dos mesmos.

Por fim, para os íons Na^{+} verificou-se uma diminuição na intensidade de corrente de pico de quase 50%. Este estava presente no meio em uma concentração 100 vezes maior

do que a de íons cobre e, desta forma, pode ter interagido preferencialmente com o biochar, deixando menos sítios de interação disponíveis para a espécie de interesse.

Na sequência, realizou-se a estimativa da precisão do procedimento proposto. As respostas obtidas, em termos de concentração, para os três níveis investigados, podem ser visualizadas na Figura 53, enquanto os desvios padrão relativos (RSD%) da repetitividade e da precisão intermediária são apresentados na Tabela 8.

FIGURA 53 - RESPOSTAS OBTIDAS PARA CADA DIA DO ESTUDO DA PRECISÃO PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ANALISADAS



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) 1,09 µmol L⁻¹;
(B) 7,87 µmol L⁻¹;
(C) 15,0 µmol L⁻¹.

TABELA 8 - DESVIOS PADRÃO RELATIVOS PARA A ESTIMATIVA DA PRECISÃO

$C_{Cu(II)} / \mu\text{mol L}^{-1}$	RSD%	
	Repetitividade	Precisão Intermediária
1,09	7,96	11,1
7,87	4,02	6,44
15,0	4,29	4,36

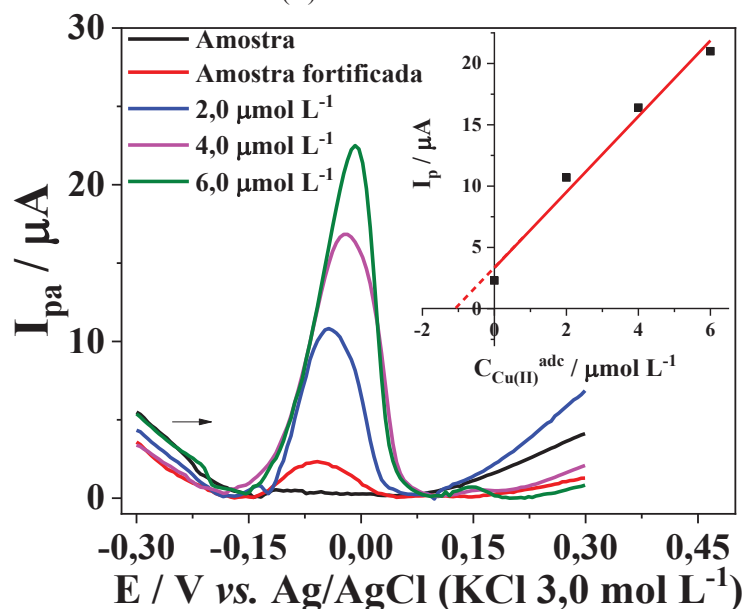
FONTE: A Autora (2022).

De modo geral, a maior dispersão das respostas foi encontrada para a concentração de 1,09 µmol L⁻¹, correspondente ao LOQ do método, e os valores de RSD% diminuíram para os maiores níveis de concentração. Em todos os casos, entretanto, os valores foram considerados adequados, levando em conta os níveis de concentração investigados, de modo que a precisão do método em si pode ser considerada adequada.

Por fim, realizou-se a determinação dos íons Cu²⁺ na amostra de água de torneira. Mesmo que o efeito de matriz não tenha sido significativo para a amostra em questão, considerando a possível presença de espécies catiônicas que podem causar alguma interferência, optou-se por realizar a determinação do analito por adição de padrão. Na Figura 54, apresenta-se os voltamogramas representativos obtidos para a amostra, a amostra fortificada e a amostra fortificada após adições sucessivas de determinadas concentrações da

espécie de interesse, bem como a curva de correlação (inserida), para um dos níveis de concentração investigados.

FIGURA 54 - VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL PARA MEDIDAS DE ADIÇÃO DE PADRÃO E CURVA DE ADIÇÃO DE PADRÃO (INSERIDA) OBTIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÍONS COBRE(II) EM ÁGUA DE TORNEIRA



FONTE: A Autora (2022).

A determinação foi realizada para a amostra sem a adição da espécie de interesse e para a amostra fortificada com duas concentrações do analito, correspondentes ao LOQ obtido para o método ($1,09 \mu\text{mol L}^{-1}$) e a concentração máxima permitida pela legislação, após a diluição ($7,87 \mu\text{mol L}^{-1}$). A partir das concentrações determinadas, calculou-se também a recuperação, de modo a estimar a exatidão do método, sendo os resultados exibidos na Tabela 9.

TABELA 9 - DETERMINAÇÃO DE ÍONS COBRE(II) EM ÁGUA DE TORNEIRA: CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS E RECUPERAÇÃO

Concentração adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)
0	< LOQ	---	---
	< LOQ	---	
	< LOQ	---	
1,09	1,01	92,7	$97 \pm 3,7$
	1,08	99,1	
	1,08	99,1	
7,87	7,58	96,3	$100 \pm 3,6$
	7,97	101,3	
	8,13	103,3	

FONTE: A Autora (2022).

Observa-se que para a amostra analisada não foi possível detectar íons Cu^{2+} em concentrações superiores ao LOD do método. Com relação às fortificações, encontraram-se valores condizentes com aqueles que haviam sido adicionados na amostra, de modo que a recuperação média para ambos os casos ficou próxima de 100%. Portanto, o procedimento proposto pode ser considerado adequado, também em termos de exatidão, para a determinação do analito em amostras de água de torneira.

4.2.10 Conclusões Parciais

A potencialidade analítica dos materiais produzidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar na pré-concentração de Cu^{2+} e posterior determinação voltamétrica foi avaliada, utilizando biochar e biochar ativado como modificadores de eletrodos de pasta de carbono. Estudos de voltametria cíclica mostraram que o material BCA400 forneceu picos mais intensos, nos sentidos anódico e catódico, para a determinação do analito. Nas caracterizações, este material apresentou uma das maiores quantidades de grupos superficiais, como grupos oxigenados, de modo que a interação do analito com a superfície eletródica pode ser favorecida, resultando em um sinal mais intenso na etapa de determinação.

A técnica de voltametria de pulso diferencial foi considerada a mais adequada para desenvolvimento de um método de determinação de íons Cu^{2+} , em termos de potencial e corrente de pico anódico. Utilizando esta técnica, investigou-se as variáveis relacionadas a construção do eletrodo, etapa de pré-concentração e etapa de varredura voltamétrica e as seguintes condições experimentais foram otimizadas: 10% de biochar no preparo da pasta de carbono; pré-concentração em solução de acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,0$) por 5 min, para concentrações de cobre na ordem de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, e 20 min, para concentrações de cobre na ordem de $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 3,0$) como solução de leitura; aplicação de potencial de condicionamento de $-0,3 \text{ V}$ durante 60 s; e amplitude de pulso de 100 mV e tempo de pulso de 200 ms como parâmetros instrumentais da técnica.

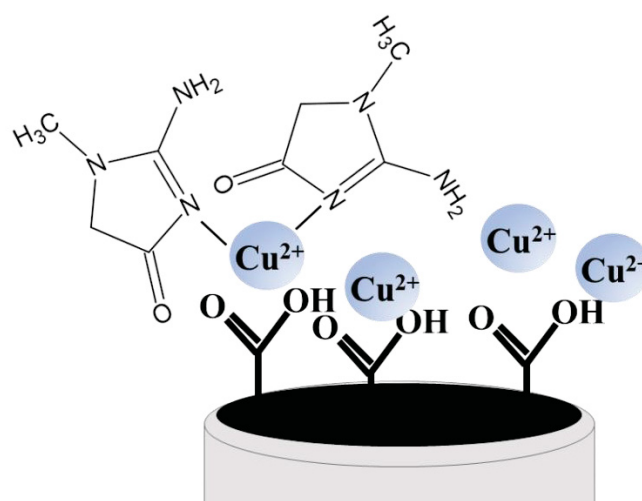
Tendo otimizado as condições experimentais, estimaram-se os parâmetros de validação para a determinação de Cu^{2+} em água de torneira. A faixa linear foi estimada na região entre $1,0$ e $15,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com comprovação da adequabilidade do modelo linear, para a região em questão, por meio do uso das ferramentas estatísticas pertinentes. Ainda, para esta faixa de trabalho, não foi observado efeito de matriz significativo, considerando diluição 1:4 (v/v) (amostra de água de torneira:solução de pré-concentração). O limite de detecção

foi estimado como $0,36 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi igual a $1,09 \mu\text{mol L}^{-1}$; ambos foram considerados adequados, pois permitem a detecção e a quantificação do analito na faixa de trabalho adotada, além de possibilitarem a determinação da concentração alvo do analito, isto é, o limite máximo estabelecido pela legislação vigente ($31,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), considerando o procedimento de diluição proposto. A precisão, em termos de repetitividade e precisão intermediária, foi considerada adequada para os níveis de concentração investigados. Visto que espécies catiônicas interferiram na resposta dos íons Cu^{2+} , optou-se por realizar a determinação do analito na amostra por adição de padrão. Para esse estudo, valores condizentes àqueles adicionados na amostra foram determinados, de modo que a exatidão do método, em termos de recuperação, também foi considerada adequada.

Deste modo, o biochar, um material ambientalmente amigável, pode ser utilizado para a determinação de Cu^{2+} em água de torneira, sendo o método proposto adequado para a finalidade pretendida, de acordo com os parâmetros de validação estimados.

SEÇÃO 4.3:

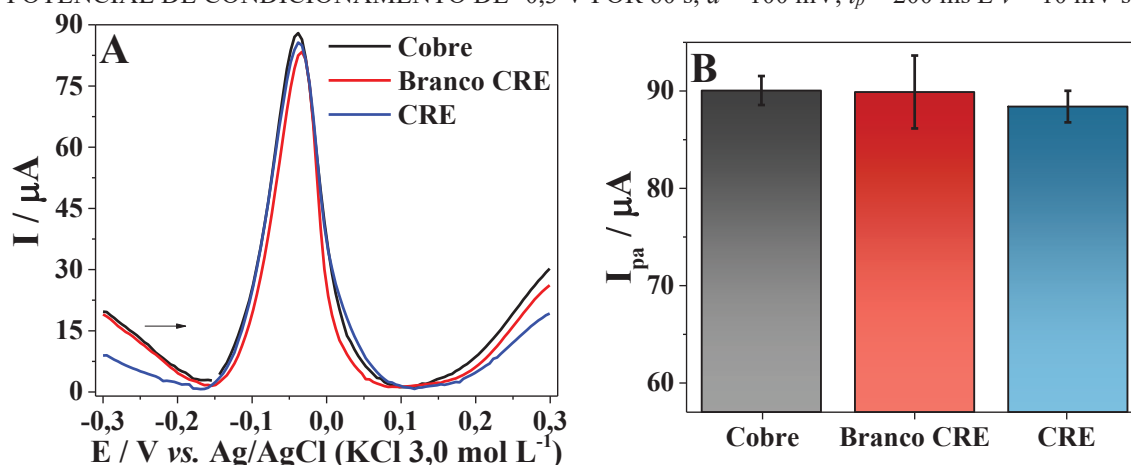
DETERMINAÇÃO DE CREATININA EM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR E ÍONS COBRE (II)



4.3.1 Avaliação da Determinação de Creatinina via Supressão do Sinal Voltamétrico de Íons Cu^{2+}

Para o desenvolvimento do procedimento de determinação indireta de creatinina, após a etapa de pré-concentração do analito, duas abordagens de determinação voltamétrica foram investigadas. Inicialmente, verificou-se o comportamento da resposta voltamétrica ao empregar o procedimento tal qual desenvolvido anteriormente para a determinação de Cu^{2+} , isto é, aplicando um potencial de condicionamento para reduzir os íons metálicos, seguido da varredura de potencial no sentido anódico. Na Figura 55A, apresenta-se voltamogramas de pulso diferencial representativos obtidos quando (i) o eletrodo foi deixado em contato somente com uma solução contendo $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de Cu^{2+} ; (ii) o eletrodo, após a incorporação de íons Cu^{2+} ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), foi deixado em contato com uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ que não continha o analito (branco da creatinina); e (iii) o eletrodo, após a incorporação de íons Cu^{2+} ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), foi deixado em contato com uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ que continha creatinina na concentração de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

FIGURA 55 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVOS DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ DE CREATININA UTILIZANDO A ABORDAGEM DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CRE EM SOLUÇÃO DE KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) EMPREGANDO POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DE $-0,3 \text{ V}$ POR 60 s, $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A Autora (2022).

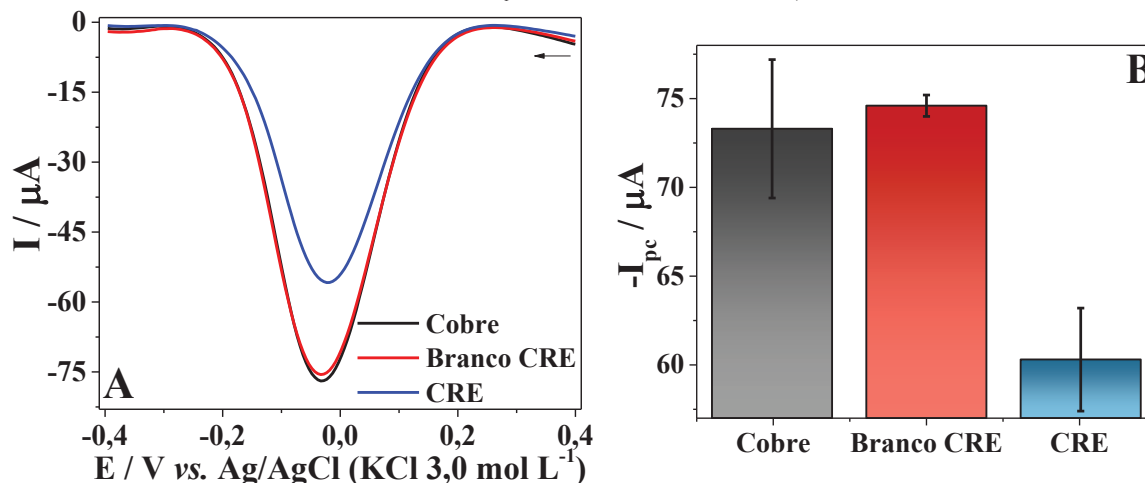
LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial;

(B) Corrente de pico anódico média obtida para cada condição investigada.

Conforme pode ser visualizado na Figura 55B, não houve diferença na resposta obtida para o cobre (Cu^{2+}) e para o branco da CRE ($t_{\text{observado}} = 0,09 < t_{\text{crítico}(0,05;2)} = 4,303$), nem para a determinação da espécie de interesse ($t_{\text{observado}} = 1,34 < t_{\text{crítico}(0,05;4)} = 2,776$). Uma possível explicação para esse comportamento é que, ao invés de atuar removendo os íons cobre da superfície eletródica para formação do complexo em solução, as moléculas de creatinina complexam-se às espécies incorporadas no eletrodo, ou seja, o próprio complexo se incorpora à superfície eletródica. Porém, quando há aplicação do potencial de condicionamento, a energia fornecida às espécies é suficiente para que ocorra a redução dos íons Cu^{2+} , seja aqueles livres (não complexados) ou complexados com a creatinina, formando Cu^0 , que posteriormente sofre o processo de oxidação.

Buscou-se, então, uma abordagem alternativa que permitisse a determinação de creatinina. Para isso, investigou-se o comportamento voltamétrico ao se empregar diretamente a varredura no sentido catódico, isto é, sem realizar o condicionamento do eletrodo. De modo similar ao descrito anteriormente, obtiveram-se voltamogramas de pulso diferencial quando o eletrodo (*i*) foi deixado em contato apenas com uma solução contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de Cu^{2+} ; (*ii*) após a incorporação de íons Cu^{2+} ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), foi deixado em contato com uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ que não continha o analito (branco da creatinina); e (*iii*) após a incorporação de íons Cu^{2+} ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), foi deixado em contato com uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ que continha creatinina na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 56A). Neste caso, optou-se por utilizar concentrações maiores de Cu^{2+} e CRE nas etapas de pré-concentração, pois estudos anteriores mostraram que a magnitude do sinal de redução para o cobre, utilizando o procedimento proposto, era menor do que aquela obtida para a oxidação após pré-condicionamento, e, para a análise da técnica a ser escolhida, desejava-se correntes de pico de magnitude comparáveis.

FIGURA 56 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVOS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE CREATININA UTILIZANDO A ABORDAGEM DE VARREDURA CATÓDICA; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CRE EM SOLUÇÃO DE KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$)



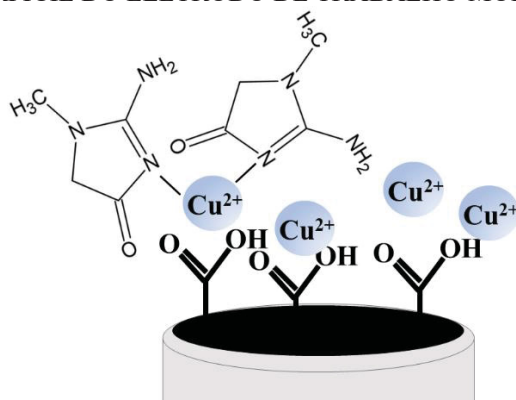
FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial;

(B) Corrente de pico catódico média obtida para cada condição investigada.

Utilizando esta abordagem, também não houve diferença na resposta obtida apenas para o cobre (Cu^{2+}) e para o branco da CRE ($t_{\text{observado}} = 0,57 < t_{\text{crítico}(0,05;2)} = 4,303$). Entretanto, na determinação indireta da espécie de interesse, observou-se supressão da corrente de pico catódica do cobre, de modo que a resposta na presença de CRE foi estatisticamente diferente da resposta controle ($t_{\text{observado}} = 4,63 > t_{\text{crítico}(0,05;3)} = 3,182$). De acordo com a literatura, em meio aquoso, o tautômero amino da creatinina possui a estrutura que resulta na formação mais favorável de complexos com Cu^{2+} , via o átomo de nitrogênio endocíclico. A estrutura mais provável do complexo formado entre essas espécies é $[\text{Cu}(\text{CRE})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, ou seja, envolve a coexistência de duas moléculas de água como ligante. Entretanto, energias de formação favoráveis, teoricamente, são encontradas para a coordenação de Cu^{2+} com até quatro moléculas de CRE, de modo que diferentes complexos entre essas espécies podem coexistir.¹⁷⁹ Deste modo, há a possibilidade de formação do complexo cobre(II)-creatinina nas condições investigadas e este processo ocasiona a diminuição das espécies disponíveis para sofrer o processo de redução, resultando na diminuição da corrente de pico correspondente, conforme representado esquematicamente na Figura 57, na qual moléculas de outros ligantes possivelmente presentes no meio (H_2O , NH_3) não foram desenhadas para facilitar a visualização.

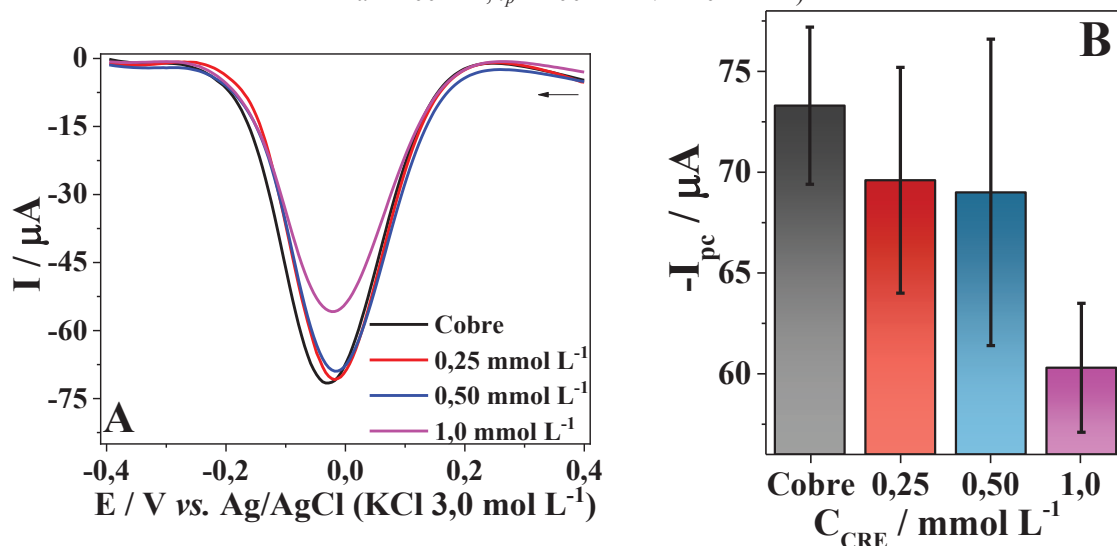
FIGURA 57 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO COBRE(II)-CREATININA NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE TRABALHO MODIFICADO COM BIOCHAR



FONTE: A Autora (2022).

Tendo verificado a potencialidade do procedimento para a determinação indireta de CRE, investigou-se o efeito da razão da concentração de Cu^{2+} e da espécie de interesse sobre a resposta voltamétrica. Para isso, o procedimento foi realizado considerando proporções de 2:1, 1:1 e 1:2 (Cu^{2+} :CRE), fixando a concentração de cobre em $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e variando a de CRE para obter as condições especificadas. Os resultados são apresentados na Figura 58.

FIGURA 58 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVOS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE CREATININA; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CRE EM SOLUÇÃO DE KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial;

(B) Corrente de pico catódico média obtida para cada condição investigada.

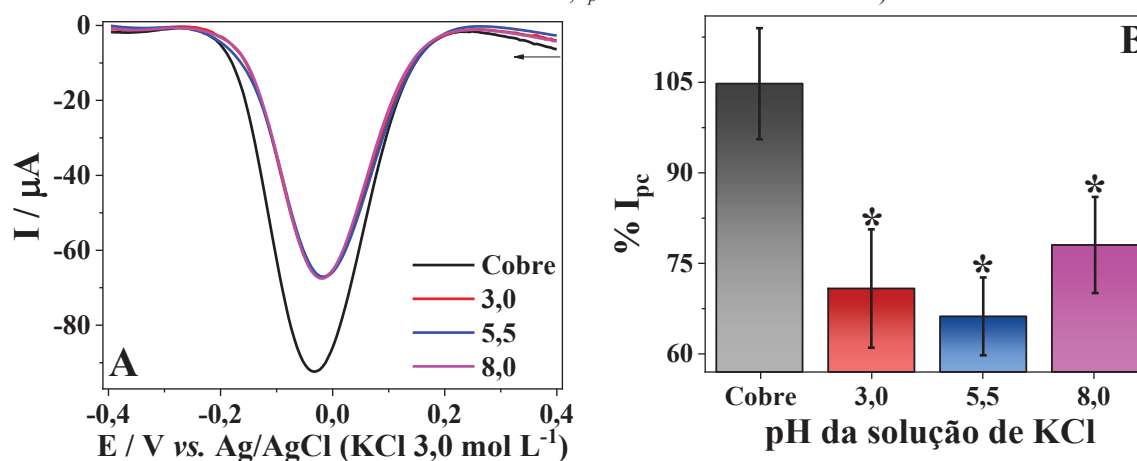
Dentre as condições investigadas, verificou-se que uma resposta para determinação de creatinina, significativamente diferente daquela obtida somente para a determinação de

cobre (II), foi obtida somente quando a concentração de CRE foi o dobro daquela utilizada na pré-concentração de Cu^{2+} , ou seja, para a proporção 1:2 (Cu^{2+} :CRE) ($t_{\text{observado}} = 4,63 > t_{\text{crítico}(0,05;3)} = 3,182$). Isto pode ter ocorrido devido a concentração em excesso de moléculas de H_2O , visto que a pré-concentração de CRE foi realizada em solução aquosa, que competem com a espécie de interesse no processo de coordenação.¹⁷⁹ Deste modo, apenas após ultrapassar esta proporção crítica, o processo de complexação ocorreu em extensão suficiente para resultar em uma resposta observável pelo procedimento e pela técnica que foram utilizados. Por isso, definiu-se para os estudos posteriores que, no mínimo, uma concentração de CRE duas vezes maior que a de Cu^{2+} deveria ser utilizada.

4.3.2 Avaliação do pH da Solução de Pré-Concentração de Creatinina

A influência do pH da solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a interação da CRE com os íons Cu^{2+} previamente imobilizados no eletrodo foi avaliada, sendo investigados os valores de pH de 3,0, 5,5 e 8,0. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 59.

FIGURA 59 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVOS DE PERCENTUAL DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE CREATININA EMPREGANDO DIFERENTES VALORES DE pH DA SOLUÇÃO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO ANALITO; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CRE POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$)



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial;
(B) Percentual de corrente de pico catódico obtido para cada condição investigada. Médias que compartilham um símbolo são estatisticamente iguais.

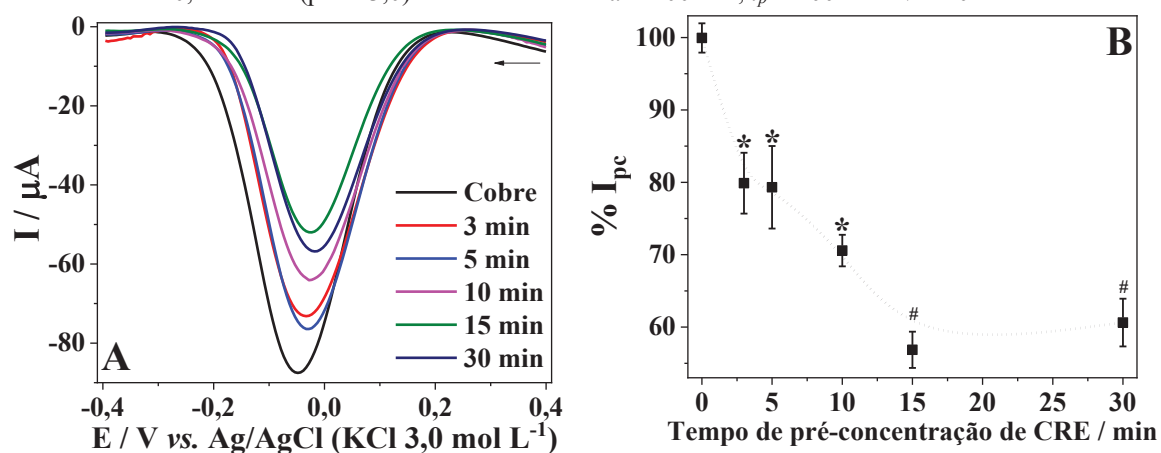
As respostas de corrente de pico catódico obtidas para cada situação investigada foram normalizadas em função da resposta média obtida para a determinação apenas de Cu^{2+} ,

para analisar melhor a supressão de sinal. Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de fator único e agrupados usando o método de Tukey, para 95 % de confiança. Conforme pode ser visualizado na Figura 57B, não houve diferença significativa entre as respostas, em termos de supressão de sinal, obtidas ao se empregar os três valores de pH. Em outras palavras, não houve influência significativa do pH sobre a resposta utilizada para a determinação do analito. Estudos anteriores indicaram que pode ocorrer remoção dos íons Cu^{2+} incorporados no eletrodo de trabalho quando o mesmo fica em contato com meios ácidos. Por isso, visando evitar respostas inconsistentes, optou-se por não utilizar pH = 3,0 nesta etapa. Além disso, como a solução utilizada não era tamponada, para obter o meio em pH = 8,0, o ajuste tinha que ser feito de imediato a utilização, adicionando uma etapa extra ao procedimento. Portanto, visto que este ajuste não é necessário para o pH = 5,5 e que a resposta em termos da supressão do sinal voltamétrico do cobre foi adequada para a determinação indireta de CRE, este meio foi utilizado para a continuidade dos estudos.

4.3.3 Avaliação do Tempo de Pré-Concentração de Creatinina

O tempo pelo qual o eletrodo era submetido à etapa de pré-concentração de CRE foi avaliado, investigando valores de 3 a 30 min, para verificar a influência sobre a supressão do sinal voltamétrico dos íons cobre. Os resultados são apresentados na Figura 60.

FIGURA 60 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E COMPARATIVOS DE PERCENTUAL DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE CREATININA EMPREGANDO DIFERENTES VALORES DE TEMPO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO ANALITO; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE CRE EM SOLUÇÃO DE KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial;

(B) Percentual de corrente de pico catódico obtido para cada condição investigada. Médias que compartilham um símbolo são estatisticamente iguais.

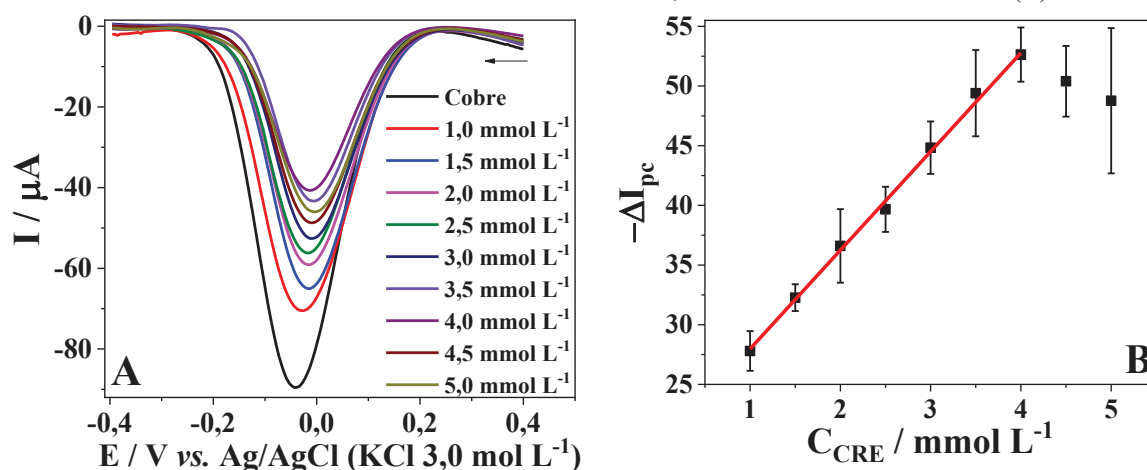
Observou-se uma tendência de aumento da supressão da intensidade da corrente de pico catódico em função do tempo de pré-concentração, indicando que quanto maior esse tempo, menor a quantidade de cobre livre (não complexado) disponível para sofrer a reação de redução. Verificou-se por meio de uma ANOVA de um fator e do agrupamento pelo método de Tukey, no nível de confiança de 95 %, que, estatisticamente, os resultados obtidos para tempos variando de 3 a 10 min foram iguais. Para o tempo de 15 min, houve uma diminuição do valor medido como resposta, o qual foi estatisticamente igual àquele obtido para o tempo de 30 min. Essa estabilização do sinal sugere que uma condição de equilíbrio entre as espécies de CRE complexadas e livres foi atingida.

Mesmo que a maior supressão da resposta tenha sido observada para o tempo de 15 min, optou-se por continuar os estudos utilizando o tempo de 10 min, devido a possibilidade de aumento da frequência de análises, visto que o tempo requerido é menor. Além disso, comparado aos menores tempo investigados (3 e 5 min), a variabilidade entre a resposta das replicatas foi a menor observada. Sendo assim, o tempo de 10 min foi adotado para a continuidade dos estudos.

4.3.4 Efeito da Concentração de Íons Cu^{2+} Imobilizados no Eletrodo de Trabalho na Determinação de Creatinina

Depois de definir as condições experimentais que proporcionaram as respostas mais adequadas para a determinação de CRE, investigou-se a influência da concentração de Cu^{2+} imobilizada no eletrodo de trabalho sobre a resposta de diferentes concentrações do analito. Inicialmente, este estudo foi conduzido por meio da pré-concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de Cu^{2+} , visando a determinação de concentrações de CRE variando de $1,0$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Os voltamogramas e a curva de calibração, relacionando a resposta em termos do negativo da diferença da corrente de pico catódico do cobre e das diferentes concentrações da espécie de interesse ($-\Delta I_{pc} = I_{pc}(\text{Cobre}) - I_{pc}(\text{Cobre-CRE})$) e as diferentes concentrações investigadas, podem ser visualizados na Figura 61.

FIGURA 61 - DETERMINAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CREATININA VIA SUPRESSÃO DO SINAL VOLTAMÉTRICO DE 0,5 mmol L⁻¹ DE ÍONS COBRE (II)



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial;
(B) Curva de calibração.

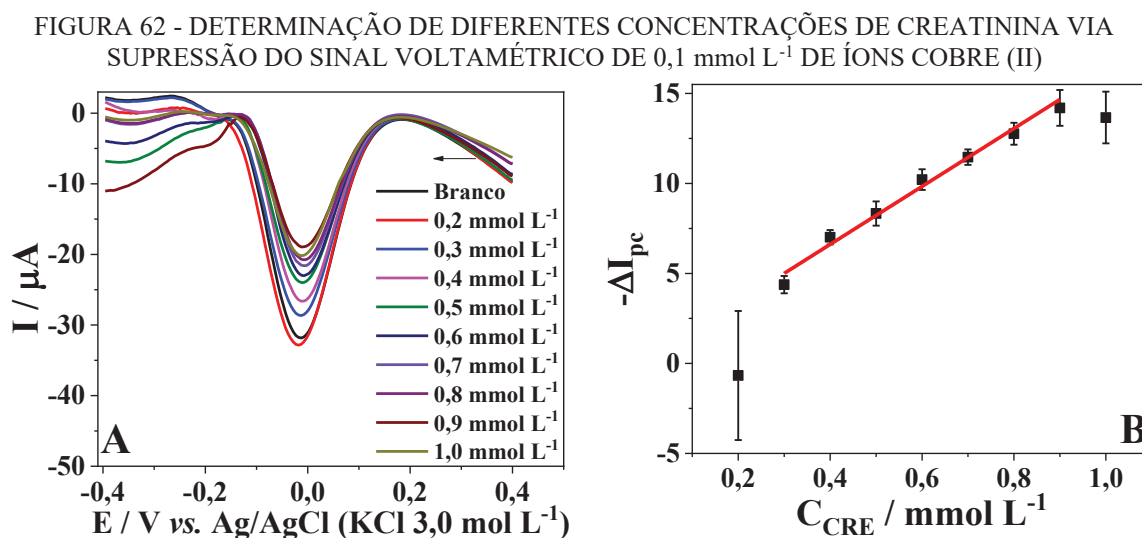
Observou-se uma tendência de aumento linear da resposta ($-\Delta I_{pc}$) conforme a concentração de CRE aumentou entre 1,0 e 4,0 mmol L⁻¹. Após este valor de concentração, ocorreu certa estabilização do valor obtido como resposta, sendo este um indicativo da saturação dos sítios disponíveis para formação do complexo Cu²⁺-CRE. A relação linear, na faixa de trabalho citada, pode ser descrita matematicamente pela Equação 10,

$$-\Delta I_{pc} (\mu A) = 19,56 + 8,357 C_{CRE} (\text{mmol L}^{-1}) \quad (\text{Equação 10})$$

apresentando um coeficiente de correlação (R^2) de 94,30 %, regressão linear significativa ($F_{\text{regressão}} = 331,7 > F_{\text{crítico}(0,05;1;19)} = 4,38$) e falta de ajuste não significativa ($F_{\text{falta de ajuste}} = 0,13 < F_{\text{crítico}(0,05;5;14)} = 2,96$), para o nível de confiança de 95 %. Assim, de acordo com a avaliação das ferramentas estatísticas, a faixa linear se apresentou adequada.^{43,134} Entretanto, a maior dispersão entre as respostas obtidas para as replicatas de algumas concentrações, resultando em desvios-padrão relativamente elevados, pode interferir diretamente na precisão do método e, até mesmo, na habilidade do mesmo em distinguir diferentes valores de concentração da espécie de interesse. Deste modo, mesmo que essa tendência de aumento da resposta tenha sido observada, a dispersão dos resultados obtidos dá um indício de que a saturação dos sítios disponíveis para a complexação já esteja ocorrendo nas demais regiões de concentração investigadas. Isto, por sua vez, poderia ocasionar um problema de ordem prática, especialmente nas determinações na presença da amostra, levando a obtenção de respostas inconsistentes.

Por isso, optou-se por verificar o comportamento de diferentes concentrações da espécie de interesse quando o eletrodo de trabalho fosse submetido ao processo de pré-concentração de uma menor quantidade do íon metálico. Para tal, realizou-se a pré-

concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de Cu^{2+} , visando a determinação de concentrações de CRE variando de $0,2$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Os voltamogramas e a curva de calibração, relacionando a resposta em termos de $-\Delta I_{pc}$ e as diferentes concentrações do analito, podem ser visualizados na Figura 62.



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas de pulso diferencial;
(B) Curva de calibração.

Neste caso, para o menor nível de concentração investigado ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), não se observou diferenciação da resposta, com relação ao sinal obtido apenas para os íons Cu^{2+} , indicando que sob as condições otimizadas o complexo não se forma em extensão o suficiente que possa ser visualizada por meio do procedimento proposto. Para os níveis seguintes, observou-se uma tendência de aumento linear da resposta ($-\Delta I_{pc}$) conforme a concentração de CRE aumentou entre $0,3$ e $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$. Após este valor de concentração, ocorreu certa estabilização do valor obtido como resposta, sendo este um indicativo da saturação dos sítios disponíveis para formação do complexo Cu^{2+} -CRE. A relação linear, na faixa citada, pode ser descrita matematicamente pela Equação 11,

$$-\Delta I_{pc}(\mu A) = 0,375 + 15,7C_{CRE}(\text{mmol L}^{-1}) \quad (\text{Equação 11})$$

apresentando um coeficiente de correlação (R^2) de 95,90 %, regressão linear significativa ($F_{\text{regressão}} = 468,6 > F_{\text{crítico}}(0,05;1;19) = 4,38$) e falta de ajuste não significativa ($F_{\text{falta de ajuste}} = 1,63 < F_{\text{crítico}}(0,05;5;14) = 2,96$), para o nível de confiança de 95 %. Ou seja, a faixa linear se mostrou adequada, em termos da avaliação utilizando as ferramentas estatísticas pertinentes.^{43,134}

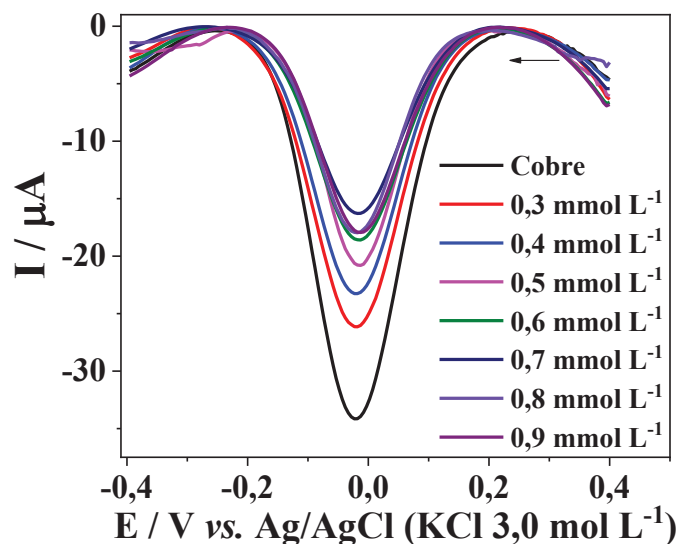
Para a curva analítica obtida ao se realizar a pré-concentração da menor concentração de Cu^{2+} e a determinação de menores níveis de concentração de CRE (Figura 62B), obteve-se maior sensibilidade: $15,7 \mu A \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$, frente a $8,36 \mu A \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$ obtida

para a curva apresentada na Figura 61B. Isto é uma vantagem quanto a determinação do analito, visto que a diferenciação entre as concentrações contidas na região linear é facilitada. Ainda, considerando a concentração alvo de CRE em amostras de urina de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, ao se utilizar o procedimento que resultou na faixa linear de trabalho de $0,3$ a $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$, pode-se empregar maior diluição da amostra na solução de pré-concentração, uma vantagem considerando a minimização do efeito de matriz. Sendo assim, a estimativa dos parâmetros de validação para a determinação de CRE em amostra de urina sintética foi realizada utilizando o procedimento que consistia na pré-concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de Cu^{2+} .

4.3.5 Estimativa dos Parâmetros de Validação para a Determinação de Creatinina em Urina Sintética

Inicialmente, verificou-se se haveria efeito de matriz na faixa de trabalho entre $0,3$ e $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$. Para isso, a amostra de urina sintética foi fortificada e então diluída na solução de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na proporção $1:20$ (v/v), para se obter os mesmos níveis de concentração utilizados na construção da curva de calibração na ausência da matriz. Realizou-se os procedimentos de pré-concentração de Cu^{2+} e de CRE e a determinação voltamétrica e voltamogramas de pulso diferencial representativos são apresentados na Figura 63.

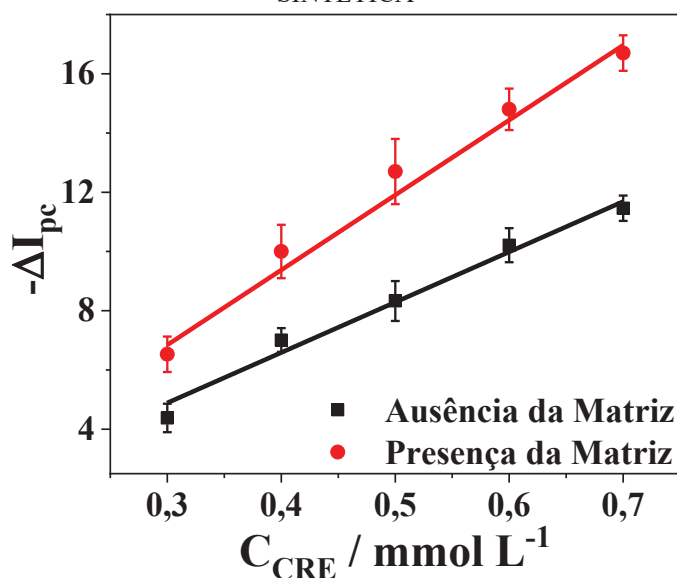
FIGURA 63 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CREATININA, NA PRESENÇA DA MATRIZ DE URINA SINTÉTICA; PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ DE Cu^{2+} EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) POR 5 min, PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CRE EM SOLUÇÃO DE $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ CONTENDO A MATRIZ POR 10 min E DETERMINAÇÃO EM SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) EMPREGANDO $a = 100 \text{ mV}$, $t_p = 200 \text{ ms}$ E $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A Autora (2022).

Neste caso, verificou-se que na presença da matriz, a saturação dos sítios disponíveis para a formação do complexo ocorreu para a concentração de $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$, após a qual observou-se resposta relativamente constante. Ou seja, a faixa de trabalho ficou mais restrita na presença da urina sintética, o que por si só já indica que há um efeito de matriz sobre o procedimento em questão. De modo a englobar a mesma faixa de trabalho, na avaliação do efeito de matriz sobre a sensibilidade do método, adotou-se a região de $0,3$ a $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ para ambas as curvas de correlação, isto é, na ausência e na presença da amostra de urina sintética, e o comparativo entre elas é apresentado na Figura 64.

FIGURA 64 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CREATININA CONSTRUÍDAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA MATRIZ DE URINA SINTÉTICA



FONTE: A Autora (2022).

Visualmente, não foi possível observar um paralelismo aproximado entre as curvas e este aspecto é confirmado quando as inclinações são comparadas, considerando a média obtida para cada uma delas, na faixa de trabalho de $0,3$ a $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$: $17,3 \pm 1,07$ e $25,2 \pm 1,99$ na ausência e na presença da matriz, respectivamente. No teste- t de comparação de médias para as inclinações, o valor de $t_{calculado} = 6,06$ foi superior ao valor de $t_{critico(0,05;3)} = 3,18$ e o valor de p ($p = 0,009$) foi inferior a $0,05$. Deste modo, as inclinações são consideradas estatisticamente diferentes, de modo que o efeito de matriz é significativo. A maior supressão do sinal voltamétrico do cobre na presença da matriz pode ter ocorrido devido a interação das espécies catiônicas inorgânicas (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) ou das espécies orgânicas (ureia, glicose) com os grupos superficiais do biochar, substituindo os íons cobre ou dificultando a ocorrência do processo redox do íon metálico imobilizado. Portanto,

considerando o efeito de matriz significativo, as estimativas de linearidade, precisão e exatidão foram realizadas a partir da curva construída na presença da amostra.¹³⁴

Para a estimativa da linearidade, primeiramente, a homogeneidade das variâncias foi verificada por meio do teste de Cochran, no nível de confiança de 95%. Nele, o valor de $C_{observado} = 0,282$ foi inferior ao valor de $C_{crítico(3;5;0,05)} = 0,689$, de modo que a hipótese de homogeneidade das variâncias pode ser aceita e a regressão linear realizada utilizando o método dos mínimos quadrados,^{43,159} sendo os dados obtidos apresentados na Tabela 10.

TABELA 10- REGRESSÃO LINEAR PARA A CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE CREATININA

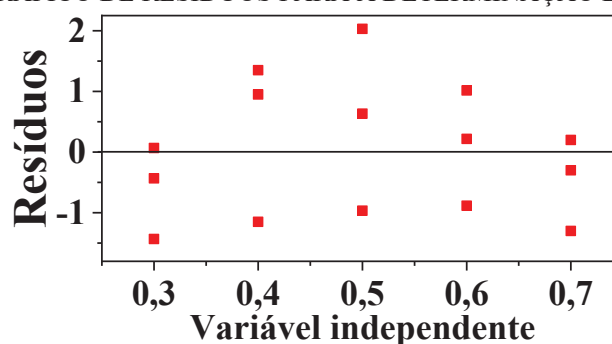
Faixa linear de trabalho (mmol L ⁻¹)				0,3 – 0,7	
Regressão ^a		Falta de ajuste ^b		<i>r</i>	R ² (%)
<i>F</i> _{regressão}	<i>p</i>	<i>F</i> _{falta de ajuste}	<i>p</i>		
159,9	0,000	0,86	0,491	0,962	91,90

^a $F_{crítico(0,05;1;13)} = 4,67$; ^b $F_{crítico(0,05;3;10)} = 3,71$

FONTE: A Autora (2022).

A análise do coeficiente de correlação (*r*), cujo valor foi próximo a 1, indicou uma possível relação linear entre a concentração de CRE e a resposta ($-ΔI_{pc}$). Por sua vez, o coeficiente de determinação (R²) mostrou que 91,90% da variação nos dados pode ser explicada pelo modelo linear. Além disso, observou-se que o valor de *F*_{regressão} foi superior ao valor de *F*_{crítico}, enquanto o valor de *F*_{falta de ajuste} foi inferior ao valor correspondente de *F*_{crítico}, o que demonstra, respectivamente, que a regressão é significativa, enquanto a falta de ajuste não é. Realizou-se, ainda, a análise dos resíduos (Figura 65), sendo observado uma distribuição aleatória dos mesmos em torno do zero, indicando que não há tendências na distribuição da variância dos dados.^{43,134}

FIGURA 65 - GRÁFICO DE RESÍDUOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CREATININA



FONTE: A Autora (2022).

Essas estimativas permitiram estabelecer a faixa de trabalho linear na região entre 0,3 e 0,7 mmol L⁻¹, de modo que a correlação entre concentração e resposta pode ser matematicamente descrita pela Equação 12.

$$-\Delta I_{pc}(\mu A) = -0,42 + 25,42C_{CRE}(\text{mmol L}^{-1}) \quad (\text{Equação 12})$$

Na sequência, o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram estimados, utilizando o valor de coeficiente angular obtido da equação da reta ($b = 25,42 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L}$) e o desvio-padrão do primeiro ponto utilizado na construção da curva analítica ($s = 0,76 \mu\text{A}$). Deste modo, obteve-se $\text{LOD} = 0,091 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{LOQ} = 0,30 \text{ mmol L}^{-1}$. O valor inferior, no caso do LOD, e a igualdade do valor do LOQ, se comparados ao valor do primeiro nível de concentração utilizado na construção da curva analítica, indicam que a CRE pode ser detectada e quantificada na faixa de trabalho adotada.

Na literatura, para a determinação voltamétrica de CRE em urina, encontram-se valores de LOD que variam de $0,2 \text{ nmol L}^{-1}$ a $0,72 \text{ mmol L}^{-1}$ e valores de LOQ que chegam a 206 nmol L^{-1} , como pode ser visualizado na Tabela 11. O valor de LOD encontrado neste trabalho está dentro da faixa daqueles reportados, e o LOQ é mais elevado. Porém, reitera-se que ambos são adequados para a finalidade pretendida, visto que a concentração alvo estipulada para a determinação do analito foi $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, a qual, após o procedimento de diluição 1:20 (v/v) na solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, corresponde a concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Este valor é superior ao LOD e ao LOQ estimados para o método, de modo que o analito pode ser detectado e quantificado considerando a faixa linear obtida ($0,3$ a $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$).

TABELA 11 - DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE CREATININA EM URINA

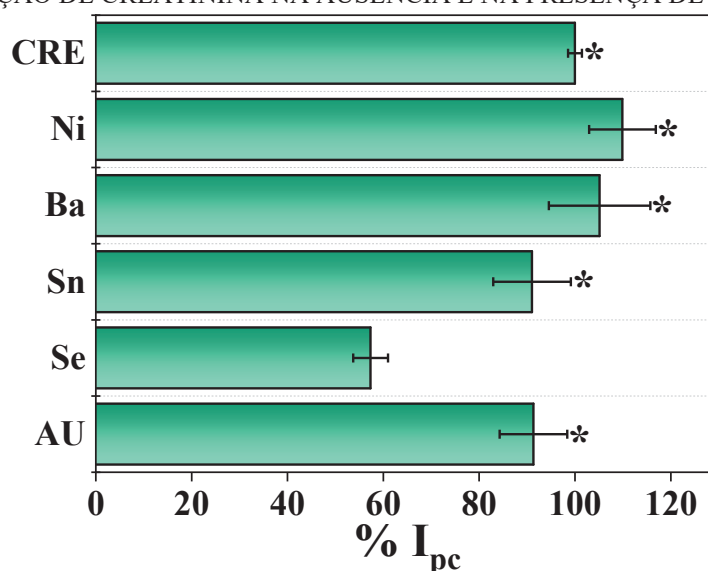
Eletrodo	Estratégia	Técnica	LOD	LOQ	Ref.
Impresso 3D + Au	Supressão do sinal do Au	SWV	$0,02 \text{ mmol L}^{-1}$	$0,05 \text{ mmol L}^{-1}$	115
Grafite escolar + fibra oca e quantum dots	Determinação direta	DPV	$0,229 \mu\text{mol L}^{-1}$	$0,548 \mu\text{mol L}^{-1}$	110
Grafite pirolítico	Supressão do sinal do picrato	LSV	$0,72 \text{ mmol L}^{-1}$	---	109
Impresso por serigrafia + negro de fumo + impregnação de Fe^{3+}	Supressão do sinal do Fe^{3+}	DPV	$0,043 \text{ mmol L}^{-1}$	---	116
GCE + MIP + Ni@polianilina	Determinação direta	DPV	$0,2 \text{ nmol L}^{-1}$	---	111
CPE + AgNPs/CNT/ácido fólico	Determinação direta	DPV	$8,0 \text{ nmol L}^{-1}$	206 nmol L^{-1}	180
GCE + WO_3 @GO dopado com carbon dots	Determinação direta	DPV	$0,220 \text{ nmol L}^{-1}$	---	181
GCE + polidopamina-rGO-azul de Nilo + CuNPs	Supressão do sinal do cobre	SWV	2 nmol L^{-1}	---	118
CPE + biochar/cobre	Supressão do sinal do cobre	DPV	$0,091 \text{ mmol L}^{-1}$	$0,30 \text{ mmol L}^{-1}$	Este trabalho

[CNT: nanotubos de carbono (do inglês, *carbon nanotubes*); CPE: eletrodo de pasta de carbono (do inglês, *carbon paste electrode*); DPV: voltametria de pulso diferencial (do inglês, *differential pulse voltammetry*); GCE: eletrodo de carbono vítreo (do inglês, *glassy carbon electrode*); GO: óxido de grafeno (do inglês, *graphene oxide*); LSV: voltametria de varredura linear (do inglês, *linear sweep voltammetry*); MIP: polímero impresso molecularmente (do inglês, *molecularly imprinted polymer*); NPs: nanopartículas; rGO: óxido de grafeno reduzido (do inglês, *reduced graphene oxide*); SWV: voltametria de onda quadrada (do inglês, *square wave voltammetry*);

FONTE: A Autora (2022).

Investigou-se também a influência de espécies inorgânicas que podem ser encontradas em urina, bem como do ácido úrico, sobre a resposta da CRE. Os resultados, em termos de corrente de pico relativa, obtidos na ausência e na presença das espécies interferentes, podem ser visualizados na Figura 66.

FIGURA 66 - COMPARAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO RELATIVA PARA A DETERMINAÇÃO DE CREATININA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE INTERFERENTES



LEGENDA: médias que compartilham um símbolo são estatisticamente iguais.

FONTE: A Autora (2022).

Observou-se, de modo geral, que a variabilidade da resposta entre as replicatas aumentou na presença das espécies interferentes, resultando em maiores valores de desvio-padrão. Entretanto, considerando as médias obtidas para cada situação, verificou-se pela utilização de uma ANOVA e teste de Tukey, no nível de confiança de 95 %, que com exceção do selênio, os demais interferentes não provocaram diferença significativa na resposta. As espécies inorgânicas que não causaram interferência, tipicamente, são encontradas em urina em concentrações na ordem de nmol L^{-1} ,¹⁷⁶ ou seja, são muito menores do que a concentração estabelecida como alvo para o analito. Deste modo, possíveis processos de interação das mesmas com o biochar contido na superfície eletródica e as espécies envolvidas no processo de interesse (Cu^{2+} e CRE) não ocorreram em extensão suficiente que afetasse a performance do método. O mesmo foi observado para o interferente orgânico ácido úrico, cuja concentração testada foi equimolar a da espécie de interesse.

O interferente selênio, mesmo estando no meio em concentração de nmol L^{-1} , possuía concentração pelo menos cinco vezes maior que a dos interferentes inorgânicos investigados. Isto é um indício que se presentes em maiores concentrações, esse tipo de espécie pode interferir na determinação de CRE. Essa observação corrobora a necessidade

de realizar a determinação do analito na amostra por adição de padrão, conforme já indicado no estudo de efeito de matriz.

Na sequência, realizou-se a estimativa da precisão do procedimento proposto. As respostas obtidas, em termos de concentração, para os três níveis investigados, podem ser visualizadas na Figura 67, enquanto os desvios padrão relativos (RSD%) da repetitividade e da precisão intermediária são apresentados na Tabela 12.

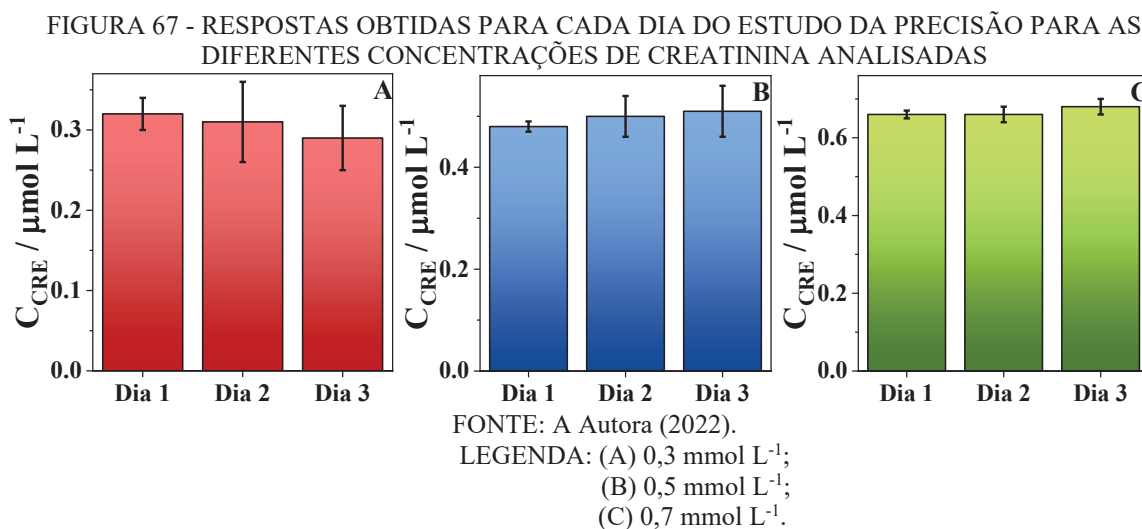


TABELA 12 - DESVIOS PADRÃO RELATIVOS PARA A ESTIMATIVA DA PRECISÃO NA DETERMINAÇÃO DE CREATININA

$C_{CRE} / \text{mmol L}^{-1}$	RSD%	
	Repetitividade	Precisão Intermediária
0,3	9,68	9,92
0,5	5,46	5,62
0,7	3,26	3,76

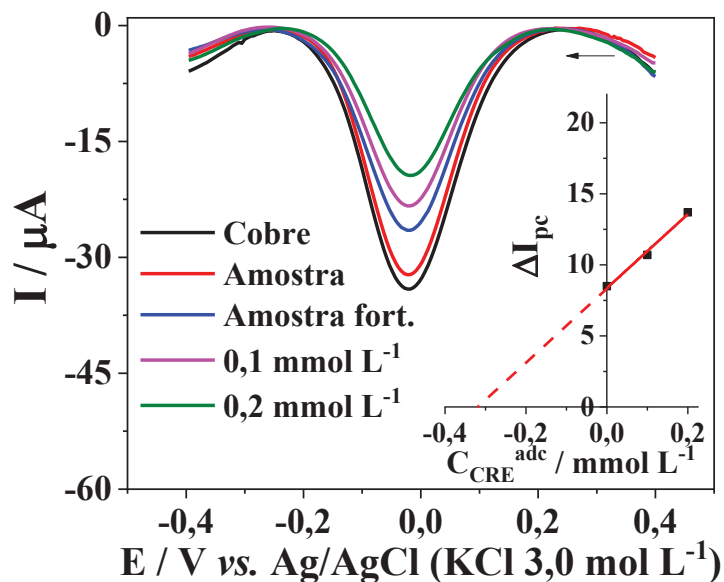
Fonte: A Autora (2022).

De modo geral, a maior dispersão das respostas foi encontrada para a concentração de 0,3 mmol L⁻¹, correspondente ao LOQ do método, e os valores de RSD% diminuíram para os maiores níveis de concentração. Em todos os casos, entretanto, os valores foram considerados adequados, levando em conta os níveis de concentração investigados, de modo que a precisão do método em si pode ser considerada adequada.

Por fim, realizou-se a determinação de CRE na amostra de urina sintética. Visto que o efeito de matriz foi significativo e verificou-se a interferência do selênio sobre a resposta do analito, a determinação foi realizada por adição de padrão. Na Figura 68, apresenta-se os voltamogramas representativos obtidos para a amostra, a amostra fortificada e a amostra fortificada após adições sucessivas de determinadas concentrações da espécie de

interesse, bem como a curva de correlação (inserida), para um dos níveis de concentração investigados.

FIGURA 68 - VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL PARA MEDIDAS DE ADIÇÃO DE PADRÃO E CURVA DE ADIÇÃO DE PADRÃO (INSERIDA) OBTIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE CREATININA EM URINA SINTÉTICA



FONTE: A Autora (2022).

A determinação foi realizada para a amostra sem a adição da espécie de interesse e para a amostra fortificada com duas concentrações do analito, correspondentes ao LOQ obtido para o método ($0,3 \text{ mmol L}^{-1}$) e a concentração alvo após a diluição ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$). A partir das concentrações determinadas, calculou-se também a recuperação, de modo a estimar a exatidão do método, sendo os resultados exibidos na Tabela 13.

TABELA 13 - DETERMINAÇÃO DE CREATININA EM URINA: CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS E RECUPERAÇÃO

Concentração adicionada (mmol L^{-1})	Concentração encontrada (mmol L^{-1})	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)
0	< LOQ	---	---
	< LOQ	---	
	< LOQ	---	
0,3	0,32	107,3	$100 \pm 7,9$
	0,28	91,7	
	0,31	101,6	
0,5	0,47	93,2	$100 \pm 7,9$
	0,54	108,7	
	0,49	98,0	

FONTE: A Autora (2022).

A amostra analisada foi preparada em laboratório e não continha creatinina, sendo assim, conforme esperado, não foi possível detectar o analito em concentrações superiores ao LOD do método. Com relação às fortificações, encontraram-se valores condizentes com

aqueles que haviam sido adicionados na amostra, de modo que a recuperação média para ambos os casos ficou próxima de 100%. Portanto, o procedimento proposto pode ser considerado adequado, também em termos de exatidão, para a determinação de creatinina em urina sintética.

4.3.6 Conclusões Parciais

A versatilidade da utilização do biochar como modificador de eletrodo visando o desenvolvimento de métodos eletroquímicos de determinação de espécies de interesse foi explorada. Para isso, empregou-se o procedimento anteriormente descrito para realizar a pré-concentração de íons Cu^{2+} e o eletrodo com as espécies imobilizadas foi utilizado para determinação indireta de creatinina, via formação do complexo com o íon metálico e supressão do sinal voltamétrico da espécie inorgânica.

Determinou-se que as melhores condições para a formação do complexo na superfície eletródica eram solução de KCl 0,1 mol L^{-1} (pH 5,5) e tempo de 10 min para pré-concentração de creatinina, sendo possível determinar concentrações do analito pelo menos duas vezes maiores do que à da quantidade de íons Cu^{2+} previamente imobilizada no eletrodo de trabalho. Mostrou-se, ainda, que ao modular a quantidade de íon metálico a ser concentrada na superfície do eletrodo, foi possível variar a faixa de trabalho para a determinação de creatinina.

Utilizando 0,1 mmol L^{-1} de Cu^{2+} na etapa de pré-concentração do íon metálico e na presença da matriz (urina sintética) na etapa de pré-concentração de creatinina, obteve-se uma faixa linear de trabalho entre 0,3 e 0,7 mmol L^{-1} . Esta foi considerada adequada para a determinação da concentração alvo do analito (10,0 mmol L^{-1}) após realizar diluição da amostra na proporção 1:20 (v/v) (amostra: KCl 0,1 mol L^{-1}), visto que se obteve como concentração diluída o valor de 0,5 mmol L^{-1} , localizado na região central da faixa de trabalho. O limite de detecção foi estimado como 0,91 mmol L^{-1} e o limite de quantificação foi igual a 0,30 mmol L^{-1} ; ambos foram considerados adequados, pois permitem a detecção e a quantificação do analito na faixa de trabalho adotada, além de possibilitarem a determinação da concentração alvo do analito. A precisão, em termos de repetitividade e precisão intermediária, foi considerada adequada para os níveis de concentração investigados. Devido ao efeito de matriz significativo e a interferência na resposta para a determinação de creatinina ocasionada por algumas espécies, optou-se por realizar a determinação do analito na amostra por adição de padrão. Para esse estudo, valores

condizentes àqueles adicionados na amostra foram determinados, de modo que a exatidão do método, em termos de recuperação, também foi considerada adequada.

Deste modo, o biochar contendo espécies imobilizadas pode ser utilizado para a determinação indireta de creatinina em urina sintética, sendo o método proposto adequado para a finalidade pretendida, de acordo com os parâmetros de validação estimados.

SEÇÃO 4.4:

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA
DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS
SARS-CoV-2 UTILIZANDO UM ELETRODO IMPRESSO DE
CARBONO MODIFICADO COM BIOCHAR**

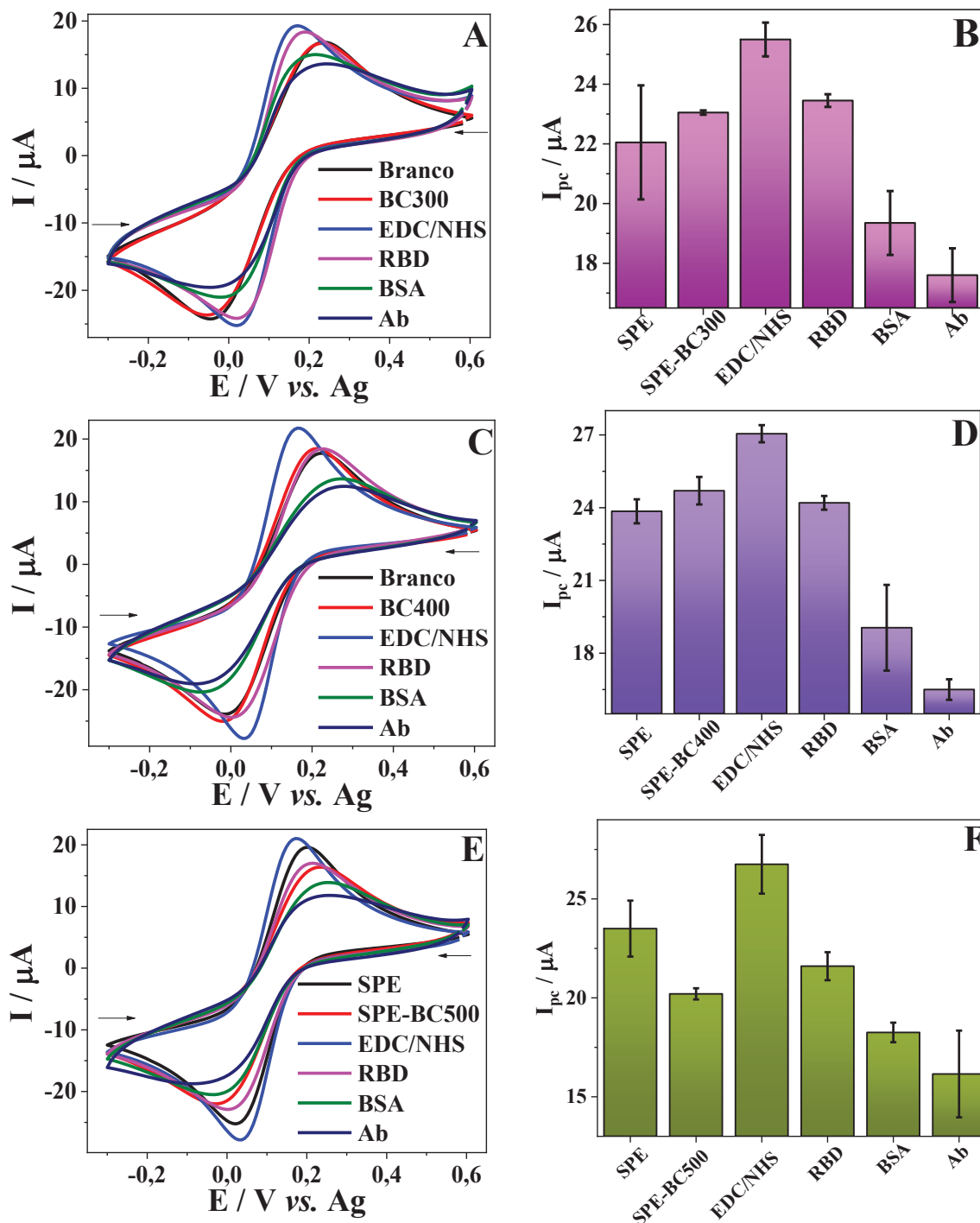


4.4.1 Avaliação dos Diferentes Materiais como Modificadores de Eletrodo Impresso para a Construção do Imunossensor Eletroquímico

De modo geral, duas considerações principais podem ser feitas ao se utilizar o biochar como modificador de eletrodo visando a imobilização de biomoléculas: (i) o material deve possuir um número adequado de grupos oxigenados, mais especificamente, grupos carboxílicos, para propiciar a reação de ligação cruzada e, posteriormente, o ancoramento proteico; e (ii) a quantidade dos grupos oxigenados deve ser adequada para não gerar repulsão eletrostática entre a sonda e a superfície eletródica, visto que, nas condições utilizadas para as medidas, possivelmente o biochar possui seus grupos superficiais negativamente carregados, e que a sonda redox também é negativamente carregada. Em outras palavras, deve-se buscar um equilíbrio quanto a quantidade de grupos oxigenados presentes no material, de modo a possibilitar o ancoramento das biomoléculas, bem como propiciar a ocorrência da reação redox da sonda.⁶⁸

Sendo assim, para avaliar a potencialidade dos materiais produzidos a partir do bagaço de cana-de-açúcar na imobilização de biomoléculas, visando a construção de um imunossensor eletroquímico para anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2, dispersões de biochar e biochar ativado foram utilizadas para modificar eletrodos de carbono impressos (SPE). A resposta dos dispositivos, após o procedimento de modificação e após cada etapa de modificação e detecção do analito foi avaliada por meio de voltametria cíclica, utilizando a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Voltamogramas cíclicos representativos para cada material, bem como as médias de corrente de pico catódico obtidas para cada etapa investigada, são apresentados nas Figuras 69, 70 e 71.

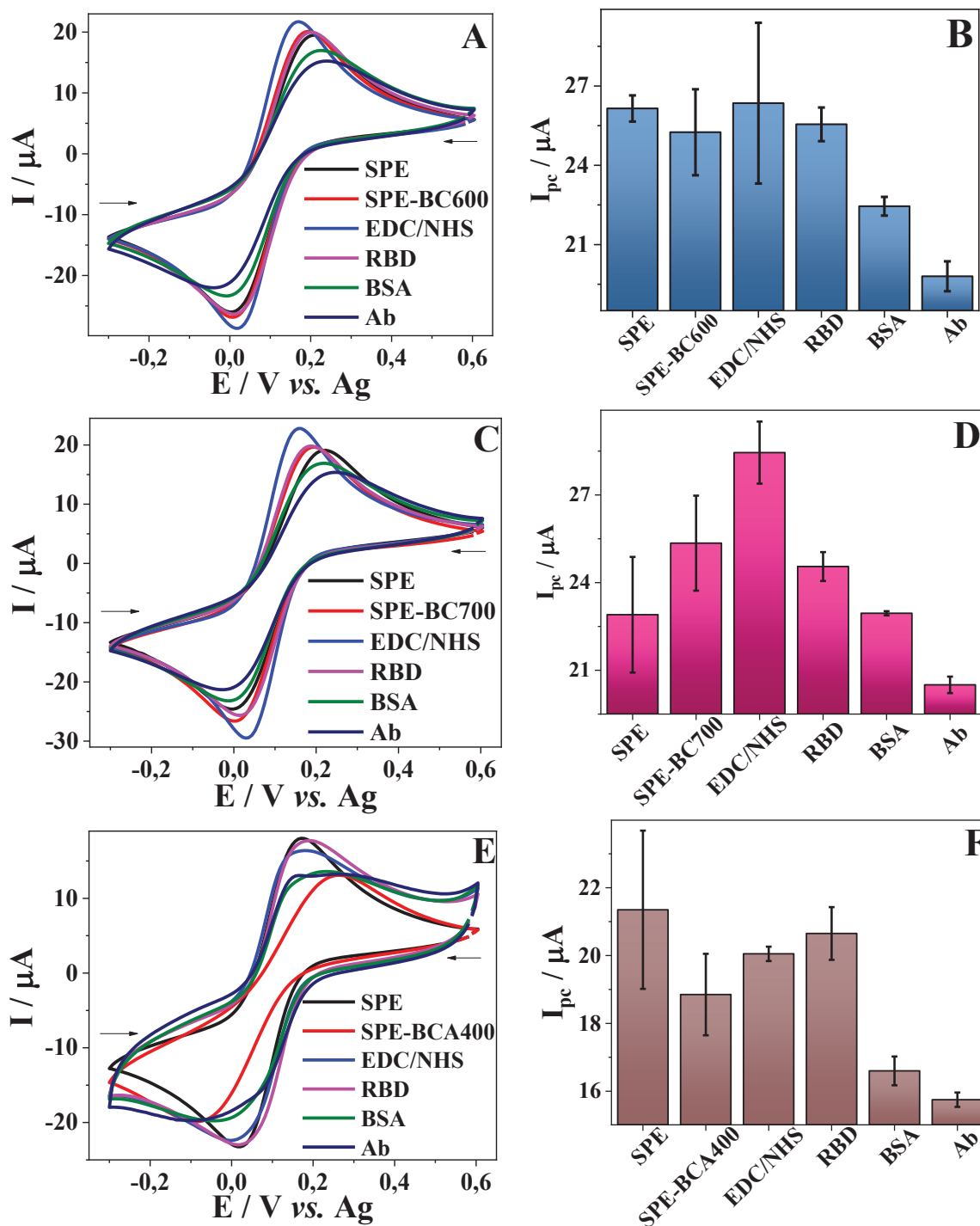
FIGURA 69 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E MÉDIAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DA Sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$), UTILIZANDO BC300, BC400 E BC500 COMO MODIFICADORES DE ELETRODO



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas cíclicos para BC300;
 (B) Médias de I_{pc} para BC300;
 (C) Voltamogramas cíclicos para BC400;
 (D) Médias de I_{pc} para BC400;
 (E) Voltamogramas cíclicos para BC500;
 (F) Médias de I_{pc} para BC500.

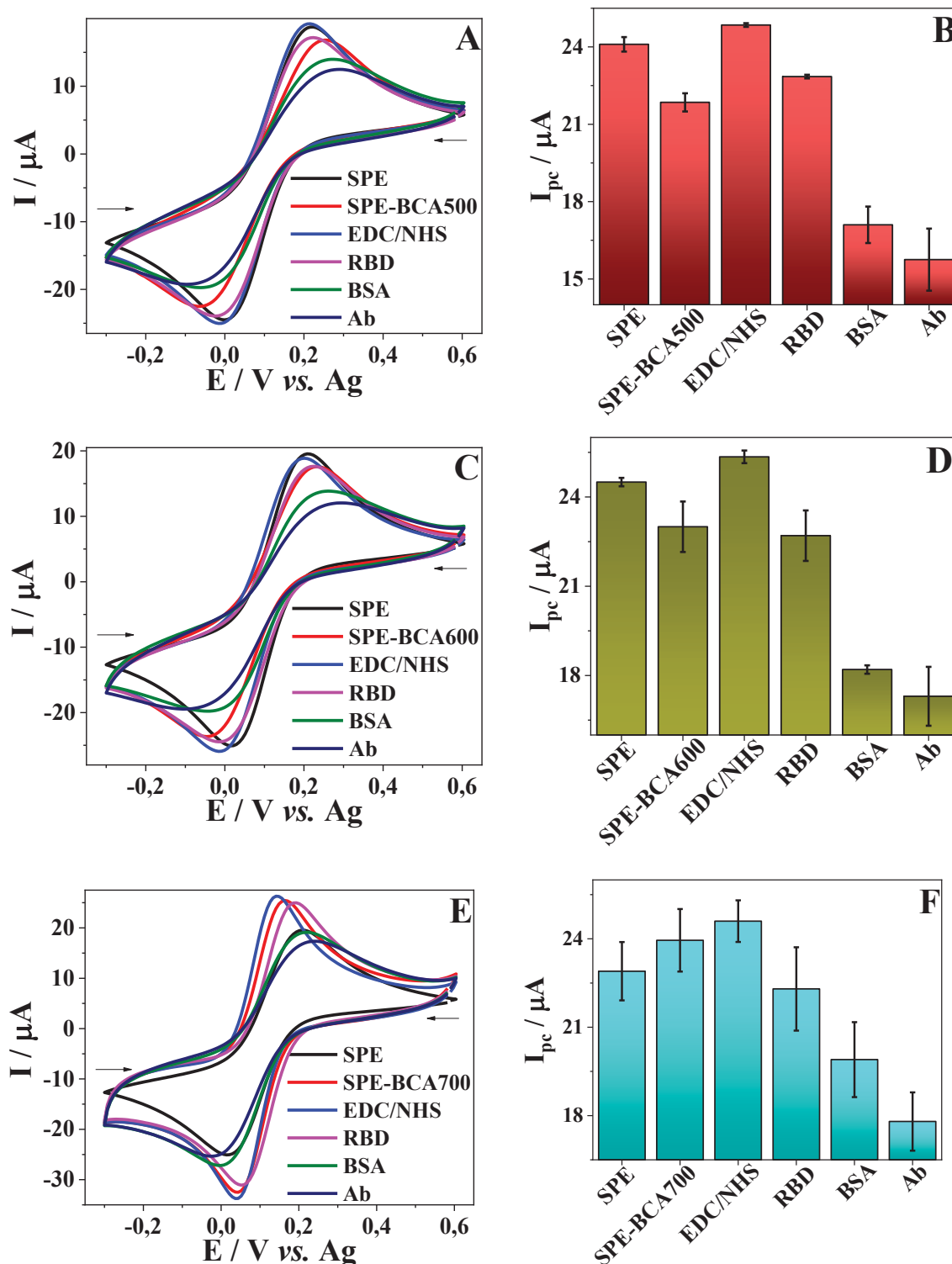
FIGURA 70 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E MÉDIAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DA Sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$), UTILIZANDO BC600, BC700 E BCA400 COMO MODIFICADORES DE ELETRODO



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas cíclicos para BC600;
 (B) Médias de I_{pc} para BC600;
 (C) Voltamogramas cíclicos para BC700;
 (D) Médias de I_{pc} para BC700;
 (E) Voltamogramas cíclicos para BCA400;
 (F) Médias de I_{pc} para BCA400.

FIGURA 71 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E MÉDIAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DA Sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$), UTILIZANDO BCA500, BCA600 E BCA700 COMO MODIFICADORES DE ELETRODO



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Voltamogramas cíclicos para BCA500;
 (B) Médias de I_{pc} para BCA500;
 (C) Voltamogramas cíclicos para BCA600;
 (D) Médias de I_{pc} para BCA600;
 (E) Voltamogramas cíclicos para BCA700;
 (F) Médias de I_{pc} para BCA700.

Conforme pode ser observado nas Figuras 69 - 71, os materiais apresentaram comportamentos distintos quanto às quatro primeiras respostas de corrente de pico catódico analisadas (SPE, SPE-B, EDC/NHS e RBD). Entretanto, em todos os casos, houve diminuição da I_{pc} após a imobilização de BSA na superfície eletrodica, indicando a ocorrência de um bloqueio da área eletroativa disponível para o processamento das reações de transferência de elétrons da sonda. Deve-se considerar, porém, que além de se ligar aos sítios não especificamente substituídos da proteína utilizada como sítio de reconhecimento (RBD, neste caso), o BSA pode ter adsorvido sobre determinadas áreas do próprio eletrodo base, o que também ocasiona bloqueio da área eletroativa.¹⁸² Sendo assim, para analisar que materiais efetivamente propiciaram o ancoramento proteico, verificou-se o processo de detecção do analito. Para isso, a resposta obtida após a imobilização de BSA foi comparada com a resposta obtida após a incubação do analito no dispositivo, utilizando teste-*t* de comparação de médias, no nível de confiança de 95 %. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 14.

TABELA 14 – COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2 UTILIZANDO OS DIFERENTES MATERIAIS NA CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSENSORES ELETROQUÍMICOS

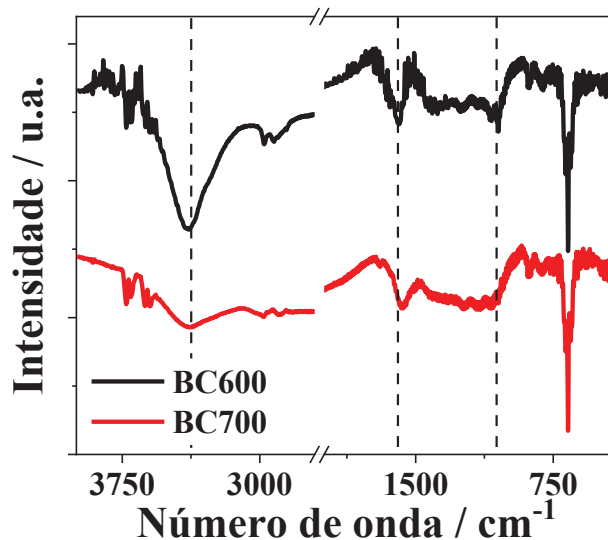
Material	$\overline{I_{pc}(BSA)} / \mu A$	$\overline{I_{pc}(Ab)} / \mu A$	$t_{observado}^*$	Graus de liberdade
BC300	19,35 ± 1,07 ₀	17,60 ± 0,90 ₂	2,17	3
BC400	19,05 ± 1,76 ₇	16,50 ± 0,42 ₄	2,43	2
BC500	18,25 ± 0,49 ₄	16,15 ± 2,19 ₂	1,62	2
BC600	22,45 ± 0,35 ₃	19,80 ± 0,56 ₅	6,88	3
BC700	22,95 ± 0,07 ₀	20,50 ± 0,28 ₂	14,56	2
BCA400	16,60 ± 0,42 ₄	15,75 ± 0,21 ₂	3,10	2
BCA500	17,10 ± 0,70 ₇	15,75 ± 1,20 ₂	1,68	3
BCA600	18,20 ± 0,14 ₁	17,30 ± 0,98 ₉	1,56	2
BCA700	24,15 ± 0,07 ₀	21,40 ± 1,55 ₅	3,06	2

* $t_{crítico(0,05;2)} = 4,30$; $t_{crítico(0,05;3)} = 3,18$

FONTE: A Autora (2022).

Analisando os dados, verificou-se que os materiais BC300, BC400, BC500 e os materiais ativados não propiciaram a detecção do analito, visto que as médias obtidas entre as respostas da etapa de detecção e da etapa anterior (BSA) foram estatisticamente iguais. Na caracterização, estes materiais apresentaram as maiores quantidades de grupos ácidos superficiais, além de maior desorganização estrutural frente aos materiais que possibilitaram a detecção do analito (BC600 e BC700). Mesmo que as bandas na caracterização por FTIR referentes a grupos oxigenados tenham sido menos intensas para os materiais BC600 e BC700, elas estavam de fato presentes nos espectros, os quais são novamente apresentados na Figura 72, para que possam ser visualizados mais detalhadamente.

FIGURA 72 – ESPECTROS DE FTIR DOS MATERIAIS BC600 E BC700

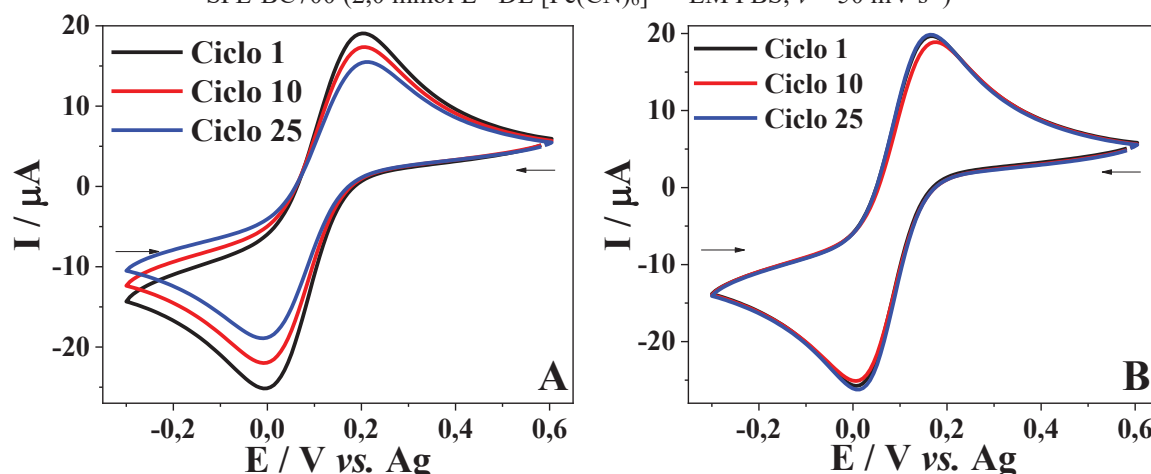


FONTE: A Autora (2022).

Sendo assim, ao contrário do que era esperado, não foram os materiais com maior quantidade de grupos ácidos que propiciaram os melhores resultados em termos de imobilização proteica e detecção do analito. Uma possível explicação para essa observação pode estar relacionada à natureza destes grupamentos, visto que as técnicas utilizadas não permitiram, de fato, quantificar cada tipo de grupo oxigenado individualmente, apenas estimá-los como um todo. Assim, os grupos carboxílicos podem não ter sido formados preponderantemente dentre os grupamentos oxigenados como um todo e, por isso, a reação de ligação cruzada e a subsequente imobilização da biomolécula não foram favorecidas ao se empregar estes materiais. Dentre BC600 e BC700, optou-se por continuar os estudos utilizando BC700, especialmente devido às respostas obtidas na demais etapas de construção do dispositivo que apresentaram menor variabilidade entre si, apontando para um processo mais preciso.

Isto posto, em seguida, verificou-se a efetividade da imobilização proteica sobre o eletrodo modificado com biochar por meio da comparação dos perfis de CV da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ obtidos para eletrodos modificados (SPE-BC700) e não modificados (SPE), após a reação de ligação cruzada com EDC/NHS. Os voltamogramas representativos obtidos após diversas varreduras para ambos os eletrodos são apresentados na Figura 73.

FIGURA 73 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE MEDIDAS SUCESSIVAS OBTIDOS PARA A Sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ APÓS A REAÇÃO DE LIGAÇÃO CRUZADA COM EDC/NHS PARA SPE E SPE-BC700 ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



FONTE: A Autora (2022).

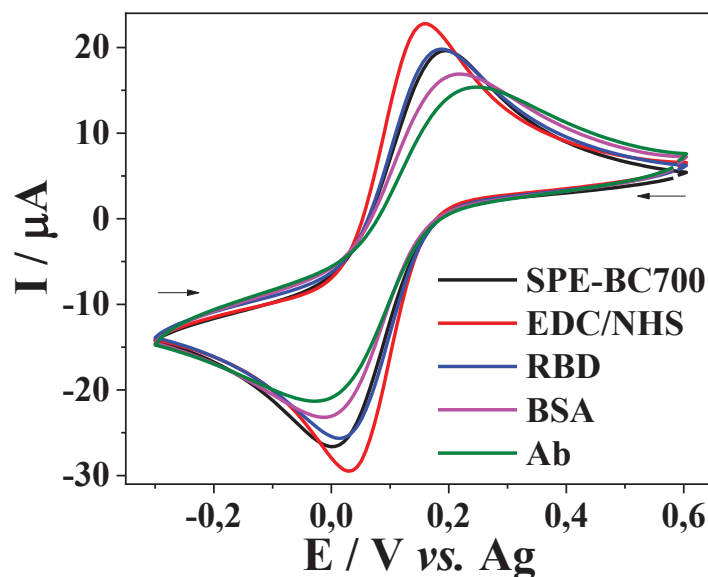
LEGENDA: (A) SPE;

(B) SPE-BC700.

O comportamento voltamétrico da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ foi similar em ambos os casos considerando as intensidades das correntes de pico anódico e catódico para SPE e SPE-BC700 no primeiro ciclo. Entretanto, a separação entre picos foi maior para o SPE ($\Delta E = E_{\text{pa}} - E_{\text{pc}} = 198 \text{ mV}$) quando comparado ao SPE-BC700 ($\Delta E = 156 \text{ mV}$), indicando que a reação da sonda redox foi menos reversível na plataforma não modificada.¹⁶⁶ Adicionalmente, as intensidades de corrente de pico diminuíram com as medidas sucessivas para o SPE, enquanto permaneceram constantes para o SPE-BC700. Isso sugere uma lixiviação gradual do intermediário de ligação cruzada da superfície do eletrodo não modificado, provavelmente porque ela não possuía grupos carboxílicos suficientes para assegurar que a reação ocorresse extensivamente. Assim, uma vez que o biochar fornece grupos carboxílicos adicionais para o eletrodo, SPE-BC700 pode ser usado para imobilizar biomoléculas por meio de reações de ligação cruzada com uma estabilidade adequada.

Na sequência, as etapas de construção do imunossensor, utilizando como modificador de eletrodo o material BC700, foram investigadas com mais detalhes, considerando o comportamento voltamétrico da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os voltamogramas cíclicos representativos, para cada etapa, são apresentados na Figura 74.

FIGURA 74 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DA Sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



FONTE: A Autora (2022).

Inicialmente, verificou-se a interação dos grupos carboxílicos do biochar com o par EDC/NHS. Nos voltamogramas cíclicos, verifica-se que as intensidades das correntes de pico anódico e catódico aumentaram após a reação de ligação cruzada, e a separação pico-a-pico diminuiu, indicando que o processo se tornou mais reversível. Isso sugere que a ativação superficial com EDC/NHS intensificou os processos redox da sonda, conforme reportado previamente.⁶⁸

A imobilização de RBD resultou em uma diminuição em ambas as intensidades de corrente de pico. Isso indica que a proteína imobilizada promoveu um bloqueio parcial da área eletroativa exposta, levando a uma menor intensidade de corrente advinda da reação redox. Na etapa seguinte, BSA foi utilizado para bloquear sítios de EDC/NHS que não tenham sido substituídos pela proteína RBD, evitando, assim, interações não específicas com a superfície do eletrodo.¹⁸² Conforme pode ser observado no voltamograma da Figura 74, uma diminuição nas intensidades de ambas as correntes de pico e um perfil voltamétrico menos reversível foram obtidos, sugerindo que os sítios não específicos foram de fato bloqueados.

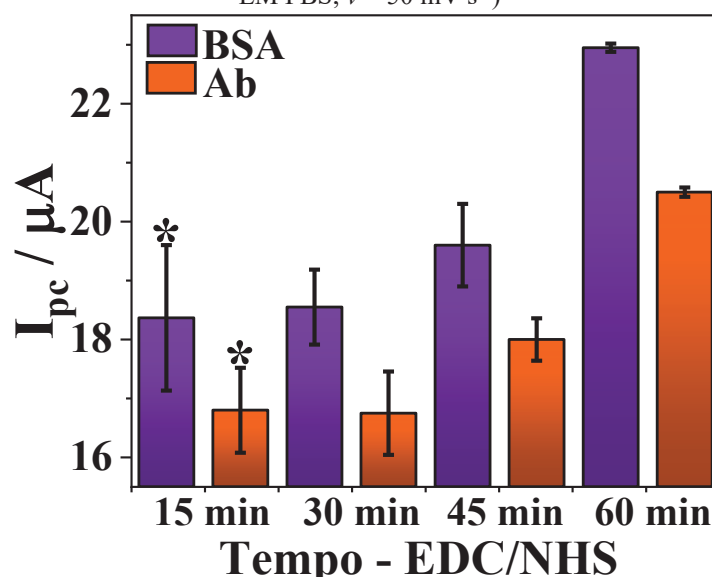
Por fim, o anticorpo contra o vírus SARS-CoV-2 foi detectado pelo imunossensor proposto. Após a incubação na presença do alvo, uma diminuição em ambas as intensidades de corrente de pico foi observada. Este comportamento se deve a formação de um imunocomplexo seletivo antígeno-anticorpo na superfície do eletrodo, levando ao bloqueio da área eletroativa e, assim, desfavorecendo a ocorrência dos processos da sonda redox.⁶⁸

Desta forma, o material sob investigação, propiciou uma detecção adequada da espécie de interesse.

4.4.2 Influência do Tempo de Incubação do Agente de Ligação Cruzada na Resposta do Imunossensor Eletroquímico

No estudo do tempo de incubação do par EDC/NHS, para formação do intermediário de ligação cruzada, investigaram-se valores de 15 a 60 min. Os resultados de média de corrente de pico catódico obtidos para a etapa de detecção e a etapa anterior a ela (BSA), para cada condição, são apresentados na Figura 75.

FIGURA 75 – RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA SONDA OBTIDAS, PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO DO PAR EDC/NHS, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO (2,0 mmol L⁻¹ DE [Fe(CN)₆]^{3-/4-} EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: médias que compartilham um símbolo são estatisticamente iguais.

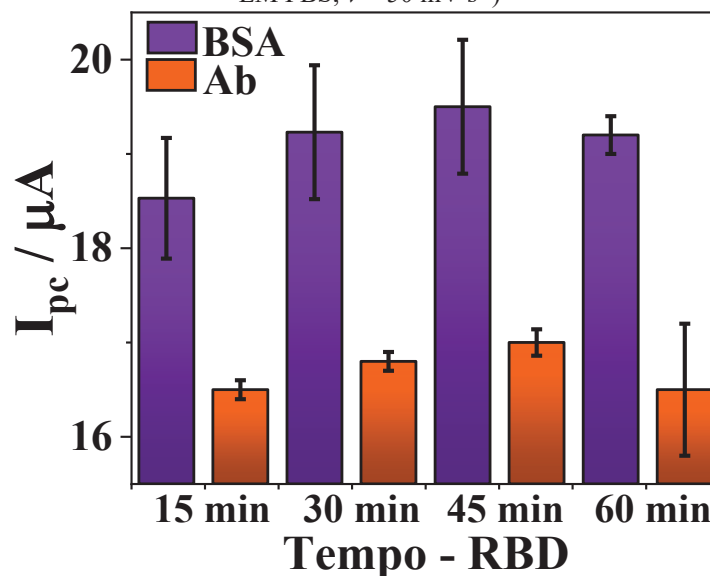
Observou-se que para o menor tempo investigado, não houve diferença significativa da resposta obtida na etapa de detecção do Ab com relação a etapa de imobilização de BSA, ou seja, não foi possível detectar o analito. Nos demais casos, a detecção ocorreu, sendo observada por meio da diminuição do sinal da etapa Ab, com relação a etapa anterior. Isto é um indicativo de que o tempo de 30 min é suficiente para a formação do intermediário de ligação cruzada na superfície eletródica, propiciando, posteriormente, a imobilização da proteína RBD em extensão suficiente para que a detecção seja bem sucedida.

A maior diferença entre a corrente de pico das etapas BSA e Ab ($\Delta I_{pc} = I_{pc(BSA)} - I_{pc(Ab)}$) foi obtida para o tempo de 60 min e, nesta situação, obtiveram-se também os menores valores de desvios-padrão, isto é, a menor variabilidade entre a resposta das replicatas. Sendo assim, visando garantir que a reação do par EDC/NHS se processe mais extensamente, resultando, na sequência, em uma maior ocupação de sítios específicos pelo elemento de reconhecimento e na detecção mais precisa do analito, optou-se por utilizar o tempo de 60 min nos estudos posteriores.

4.4.3 Influência do Tempo e Temperatura de Incubação e da Concentração da Proteína Viral na Resposta do Imunossensor Eletroquímico

Para a imobilização do elemento de reconhecimento na superfície do eletrodo, o tempo e a temperatura de incubação, bem como a concentração da proteína RBD, foram investigados. No estudo do tempo de incubação, investigaram-se valores de 15 a 60 min. Os resultados de média de corrente de pico catódico obtidos para a etapa de detecção e a etapa anterior a ela (BSA), para cada condição, são apresentados na Figura 76.

FIGURA 76 – RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA SONDA, OBTIDAS PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO DE RBD, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



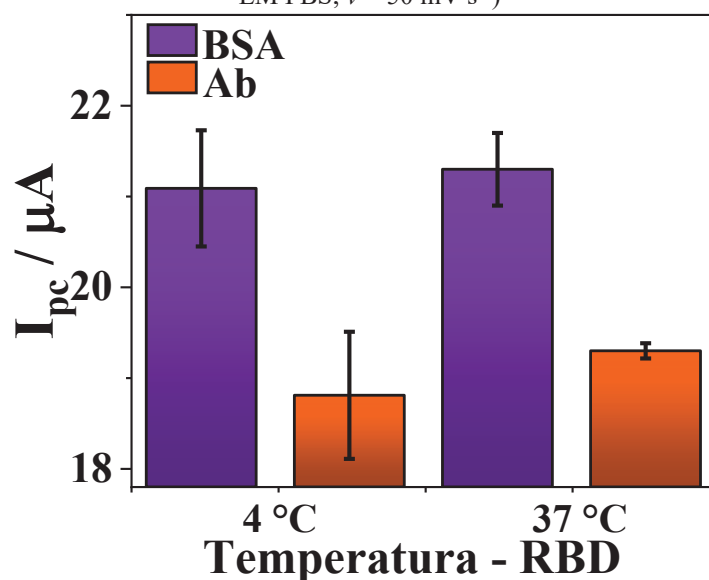
FONTE: A Autora (2022).

Neste caso, foi possível detectar o analito em todas as condições investigadas, sendo obtidas respostas similares em termos de ΔI_{pc} para todos os tempos. Assim, como a reação de imobilização do RBD na superfície eletródica pode se processar em extensão suficiente

para permitir a detecção adequada do anticorpo já no menor tempo investigado, optou-se por continuar os estudos utilizando o tempo de 15 min, para diminuir o tempo total de construção do imunossensor.

Na sequência, a temperatura de incubação do RBD foi investigada nos valores de 4 °C e 37 °C. Conforme pode ser observado na Figura 77, ambos os casos propiciaram a detecção do analito, além de fornecerem respostas similares. Entretanto, menores desvios-padrão foram obtidos para a temperatura de 37 °C, sendo esta considerada, portanto, mais adequada para realizar a incubação do elemento de reconhecimento.

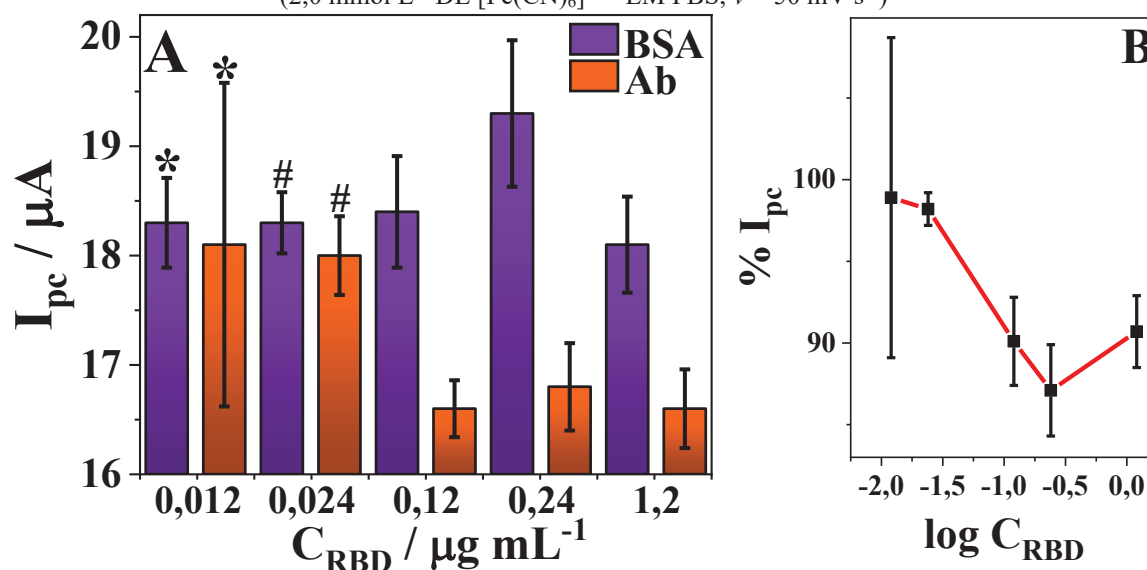
FIGURA 77 – RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA Sonda, OBTIDAS PARA AS DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO DE RBD, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO (2,0 mmol L⁻¹ DE [Fe(CN)₆]^{3-/4-} EM PBS; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



FONTE: A Autora (2022).

Por fim, investigou-se a concentração de RBD a ser imobilizada na superfície eletródica, empregando valores de 0,012 a 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados de média de corrente de pico catódico obtidos para a etapa de detecção e a etapa anterior a ela (BSA), para cada condição, bem como o gráfico de correlação do logaritmo da concentração de RBD pela corrente de pico normalizada, de acordo com a Equação 7, são apresentados na Figura 78.

FIGURA 78 – RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA SONDA, OBTIDAS PARA A INCUBAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE RBD, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO E CORRELAÇÃO ENTRE O LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO DE RBD E A CORRENTE DE DETECÇÃO NORMALIZADA ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: (A) Comparação de I_{pc} para as etapas de incubação de BSA e de detecção. Médias que compartilham um símbolo são estatisticamente iguais;

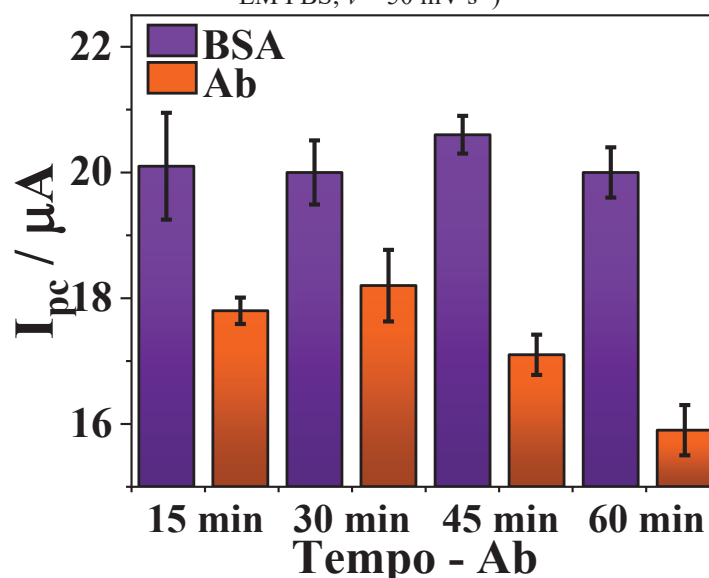
(B) $\log C_{RBD}$ vs. $\%I_{pc}$.

Para as menores concentrações investigadas ($0,012$ e $0,024 \text{ µg mL}^{-1}$), não se observou diferenças nos valores de corrente de pico para as medidas obtidas após a incubação de BSA e para a detecção de Ab. Isto sugere que a quantidade de RBD na superfície do eletrodo não foi suficiente para promover a formação efetiva do imunocomplexo. Para as maiores concentrações de RBD, a detecção de Ab ocorreu. Ainda que estatisticamente a resposta normalizada para as três maiores concentrações investigadas ($0,12$, $0,24$ e $1,2 \text{ µg mL}^{-1}$) tenha sido igual, observou-se uma tendência de diminuição linear do valor médio de $\%I_{pc}$ até a concentração de RBD de $0,24 \text{ µg mL}^{-1}$ (Figura 78B), seguido de uma tendência de aumento do valor médio de $\%I_{pc}$. Este comportamento sugere a ocorrência do Efeito *Hook* para maiores concentrações de antígeno, que se refere a preferência de interação das moléculas de antígeno entre si,¹⁸³ em detrimento da imobilização na superfície eletródica. Por isso, a concentração de RBD de $0,12 \text{ µg mL}^{-1}$ foi utilizada na continuidade dos estudos.

4.4.4 Influência do Tempo e Temperatura de Incubação do Analito na Resposta do Imunossensor Eletroquímico

Para a avaliação das variáveis relacionadas a detecção da espécie alvo (anticorpos contra a proteína S do vírus SARS-CoV-2), o tempo e a temperatura de incubação do analito foram investigados. No estudo do tempo de incubação, avaliaram-se valores de 15 a 60 min. Os resultados de média de corrente de pico catódico obtidos para a etapa de detecção e a etapa anterior a ela (BSA), para cada condição, são apresentados na Figura 79.

FIGURA 79 – RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA Sonda, OBTIDAS PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO DE Ab, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



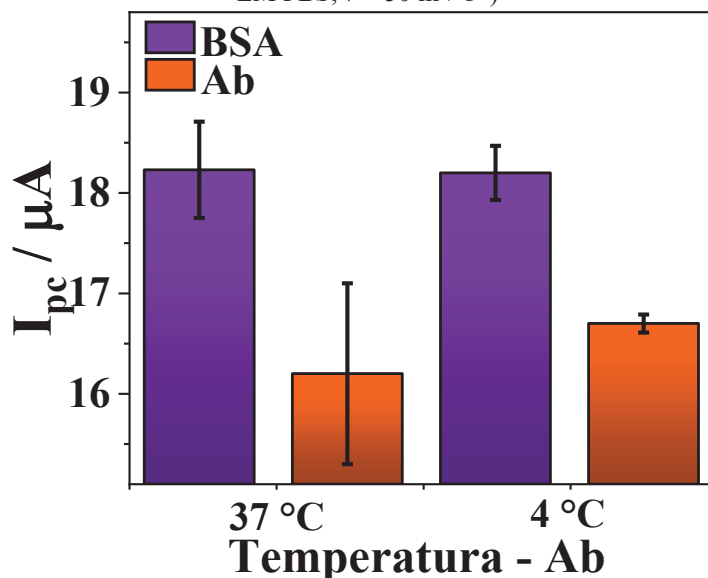
FONTE: A Autora (2022).

Todas as condições investigadas propiciaram a detecção do analito, o que mostrou a possibilidade de se utilizar o tempo de 15 min nesta etapa. Entretanto, maiores valores de ΔI_{pc} foram obtidos ao se empregar tempos mais elevados. Ademais, conhecimento de outros trabalhos realizados no grupo de pesquisa,^{180,181} apontava para a necessidade de se empregar maiores tempos de incubação, considerando especialmente a detecção da espécie alvo em matrizes biológicas, tal qual o soro humano. Por isso, optou-se por continuar utilizando o tempo de 60 min para a incubação do anticorpo.

Na sequência, temperaturas de $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e $37 \text{ }^\circ\text{C}$ foram investigadas para a incubação do anticorpo. Conforme pode ser observado na Figura 80, ambos os casos propiciaram a detecção do analito, além de fornecerem respostas similares em termos de ΔI_{pc} . Entretanto,

menores desvios-padrão foram obtidos para a temperatura de 4 °C, sendo esta considerada, portanto, mais adequada para realizar a etapa de detecção.

FIGURA 80 – RESPOSTAS DE CORRENTE DE PICO CATÓDICO DA Sonda, OBTIDAS PARA AS DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO DE Ab, NAS ETAPAS DE LEITURA APÓS A IMOBILIZAÇÃO DE BSA E APÓS A INCUBAÇÃO DO ANTICORPO (2,0 mmol L⁻¹ DE [Fe(CN)₆]^{3-/4-} EM PBS; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)

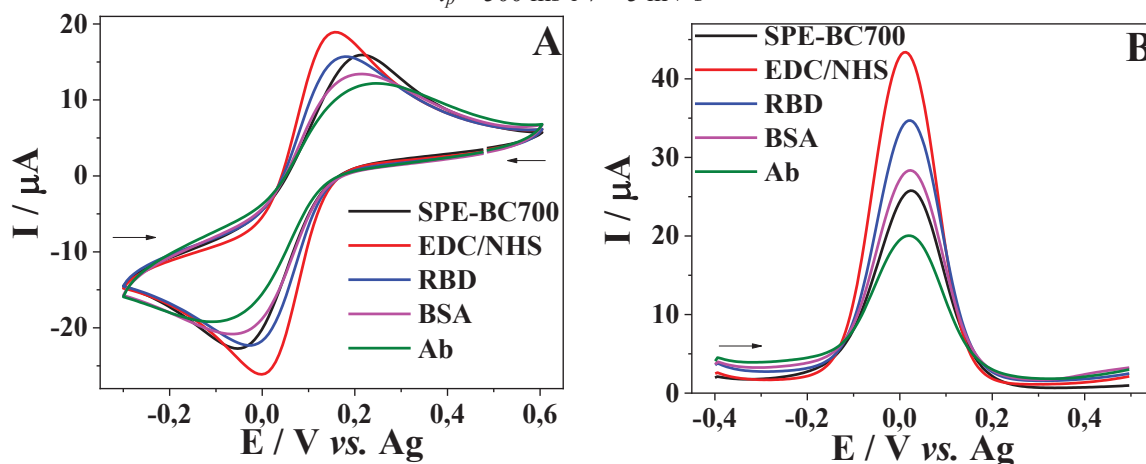


FONTE: A Autora (2022).

4.4.5 Avaliação da Voltametria de Pulso Diferencial como Técnica de Detecção

Para fins analíticos, uma técnica voltamétrica de pulso, voltametria de pulso diferencial (DPV), foi empregada para diminuir a influência da corrente capacitiva sobre as respostas voltamétricas.¹⁶⁴ A resposta para as diferentes etapas de construção do sensor e para a detecção do analito, utilizando a técnica de DPV, foi comparada com aquela obtida por CV, considerando as condições previamente otimizadas. Voltamogramas representativas, para ambas as técnicas, são apresentados na Figura 81.

FIGURA 81 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DA Sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS); CV: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; DPV: POTENCIAL DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE $-0,4 \text{ V}$ POR 10 s , $a = 150 \text{ mV}$, $t_p = 500 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A Autora (2022).

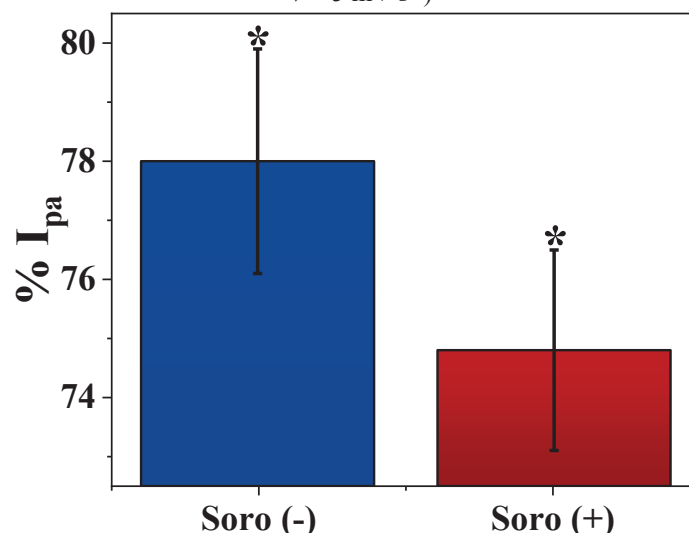
LEGENDA: (A) Voltamogramas cíclicos;
(B) Voltamogramas de pulso diferencial.

Para DPV, os resultados foram similares ao comportamento observado para as medidas de CV: um aumento na magnitude da corrente de pico após a imobilização com EDC/NHS, seguido de diminuições sucessivas na intensidade de corrente de pico para as etapas seguintes de construção do dispositivo. Todavia, quando o sinal da detecção é comparado, uma supressão para $74 \pm 1,8 \%$ do sinal do BSA foi observada para DPV, enquanto uma resposta de $87 \pm 3,8 \%$ foi obtida para CV. Portanto, uma vez que a resposta é medida por supressão de sinal, a técnica de DPV foi considerada mais adequada para verificar as características analíticas da aplicação do imunossensor.

4.4.6 Estimativa dos Parâmetros de Analíticos para a Detecção de Anticorpos Contra o Vírus SARS-CoV-2 em Amostra de Soro Comercial

Para verificar a potencialidade de aplicação do imunossensor proposto na detecção de anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2 em soro humano, verificou-se a resposta do dispositivo, utilizando as condições previamente otimizadas, para a incubação de amostras de soro comercial (soro negativo) e soro comercial fortificado (soro positivo). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 82.

FIGURA 82 – RESPOSTAS OBTIDAS PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2 EM SORO COMERCIAL E SORO COMERCIAL FORTIFICADO, UTILIZANDO VOLUME E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE BSA DE 5 μL E 4 $^{\circ}\text{C}$ (2,0 mmol L^{-1} DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS, POTENCIAL DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE -0,4 V POR 10 s, $a = 150 \text{ mV}$, $t_p = 500 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$)



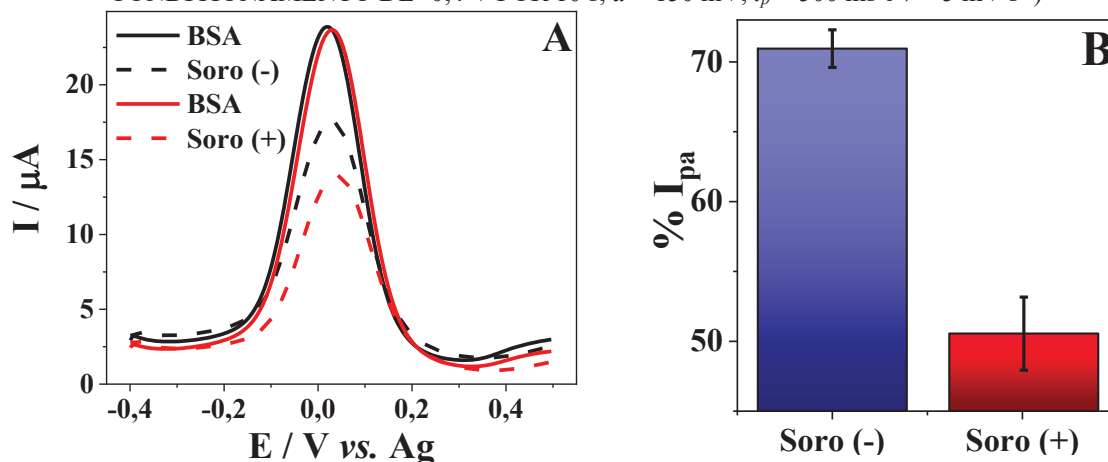
FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: médias que compartilham um símbolo são estatisticamente iguais.

Conforme pode ser observado na Figura 82, as respostas obtidas para as amostras negativa e positiva foram estatisticamente iguais ($t_{calculado} = 2,17 < t_{critico(0,05;3)} = 3,18$). Ou seja, houve efeito de matriz, de modo que componentes não específicos presentes no soro interagiram com sítios não bloqueados do elemento de reconhecimento ou até mesmo com áreas não substituídas do próprio eletrodo base. Sendo assim, adaptações metodológicas tiveram que ser realizadas para inibir esse tipo de interação, possibilitando a diferenciação de sinais positivos e negativos a presença do analito.

Nesse sentido, optou-se por aumentar o volume de BSA gotejado no eletrodo para 7,5 μL , visando maior recobrimento da área sobre a qual o imunossensor estava sendo construído, seguido de incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera úmida, para favorecer a cinética da reação. Os resultados obtidos para as amostras negativa e positiva, empregando estas adaptações no procedimento, são apresentados na Figura 83.

FIGURA 83 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL E RESPOSTAS OBTIDAS PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2 EM SORO COMERCIAL E SORO COMERCIAL FORTIFICADO, UTILIZANDO VOLUME E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE BSA DE 7,5 μL E 37 $^{\circ}\text{C}$ (2,0 mmol L^{-1} DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS, POTENCIAL DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE -0,4 V POR 10 s, $a = 150 \text{ mV}$, $t_p = 500 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$)

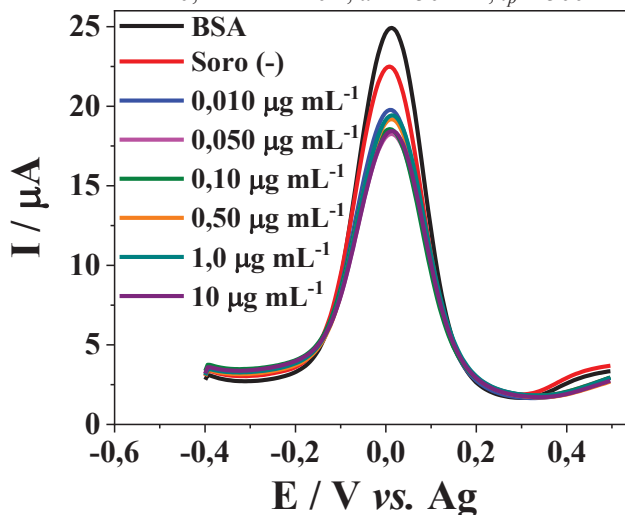


FONTE: A Autora (2022).

Utilizando esta abordagem, obtiveram-se médias estatisticamente diferentes para as amostras ($t_{\text{calculado}} = 9,80 < t_{\text{critico}(0,05;2)} = 4,30$). Ou seja, foi possível diferenciar as respostas de amostras de soro negativas e positivas a presença do anticorpo IgG contra a proteína RBD do vírus SARS-CoV-2. Isto mostra que a utilização do biochar na imobilização de biomoléculas foi bem-sucedida quanto a determinação do analito em uma matriz complexa.

Na sequência, a resposta de amostras de soro fortificadas com diferentes concentrações do analito foi avaliada e comparada a resposta obtida para uma amostra de soro não fortificada (soro negativo). Voltamogramas de pulso diferencial representativos para cada condição analisada são apresentados na Figura 84.

FIGURA 84 – VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL PARA A DETECÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2 EM SORO COMERCIAL FORTIFICADO (2,0 mmol L^{-1} DE $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS, POTENCIAL DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE -0,4 V POR 10 s, $a = 150 \text{ mV}$, $t_p = 500 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$)

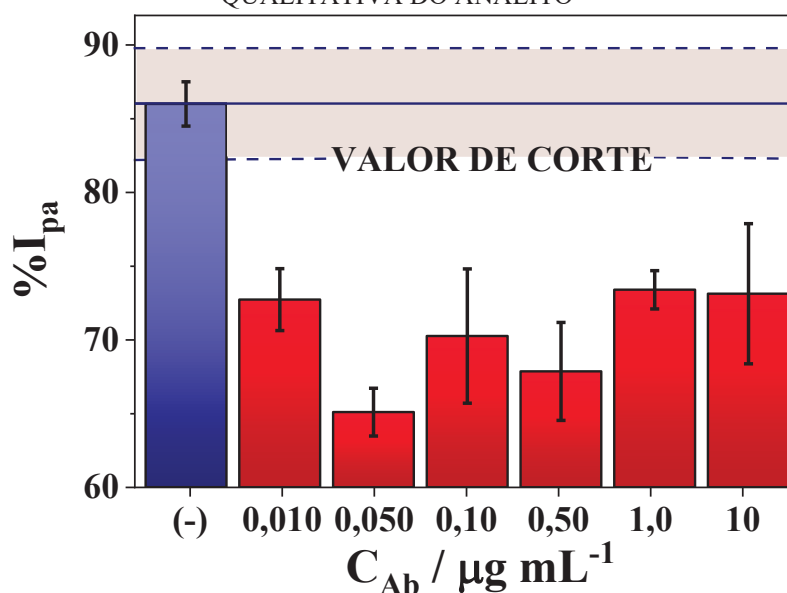


FONTE: A Autora (2022).

Conforme pode ser observado nos voltamogramas, uma diferenciação quantitativa entre a resposta para as diferentes concentrações não pode ser estabelecida. Comportamentos similares já foram descritos para outros imunossensores, sendo relacionados com a complexidade da matriz das amostras, visto que diversos concomitantes estão presentes, afetando a interação entre os anticorpos específicos e a camada de reconhecimento.^{184,185}

Mesmo que o perfil de resposta do imunossensor não permita a quantificação do analito, o dispositivo baseado em um valor de corte ainda pode ser aplicado com sucesso para diagnósticos qualitativos. Nesse sentido, calculou-se o intervalo de confiança da resposta negativa e seu limite inferior foi utilizado como valor de corte, conforme pode ser visualizado na Figura 85.

FIGURA 85 – COMPARATIVO DAS RESPOSTAS OBTIDA PARA A AMOSTRA DE SORO NEGATIVO E PARA A DETECÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2 EM SORO COMERCIAL FORTIFICADO (2,0 mmol L⁻¹ DE [Fe(CN)₆]^{3-/4-} EM PBS, POTENCIAL DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE -0,4 V POR 10 s, $a = 150$ mV, $t_p = 500$ ms $v = 5$ mV s⁻¹) E REPRESENTAÇÃO DO VALOR DE CORTE ESTABELECIDO PARA A DETECÇÃO QUALITATIVA DO ANALITO

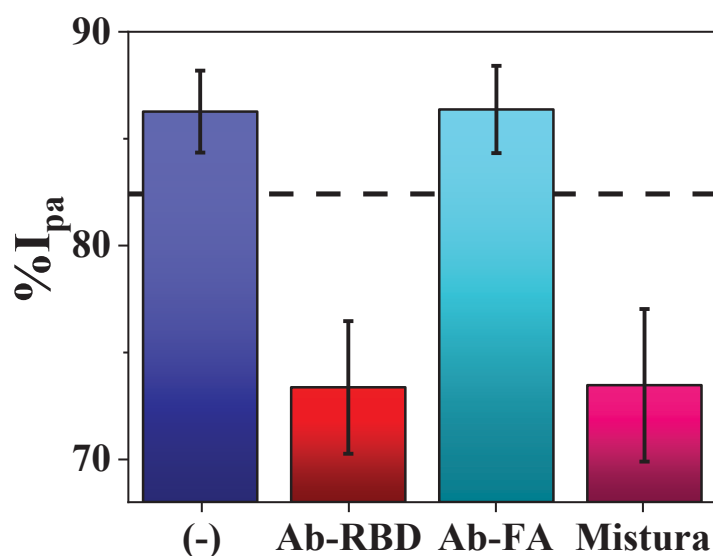


FONTE: A Autora (2022).

Sendo assim, considerando o valor de corte, se a diminuição da resposta do Ab, em comparação a do BSA, é acima de 82,3 %, a amostra é negativa. Por outro lado, se essa diminuição é abaixo de 82,3 %, a amostra é considerada positiva para a presença de anticorpos específicos contra a proteína RBD do SARS-CoV-2. Portanto, o dispositivo pode ser utilizado para fins qualitativos, por exemplo, para indicar se o sistema imune ainda é capaz de responder a presença do vírus SARS-CoV-2, ou até mesmo se doses adicionais de vacinas são necessárias para reforçar a capacidade humoral de combater o patógeno.

Em seguida, a seletividade foi avaliada por meio da submissão do imunossensor a amostras de soro fortificadas com anticorpos específicos contra SARS-CoV-2 (Ab-RBD), anticorpos específicos contra febre amarela (Ab-FA) e uma mistura dos dois. As respostas foram comparadas com aquela obtida para uma amostra de soro negativo, e os resultados são apresentados na Figura 86.

FIGURA 86 – AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DO IMUNOSSENSOR: MÉDIA DE $\%I_{pa}$ PARA AMOSTRAS DE SORO NEGATIVO E AMOSTRAS DE SORO FORTIFICADAS COM ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA SARS-CoV-2 (Ab-RBD), ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA FEBRE AMARELA (Ab-FA) E UMA MISTURA DE AMBOS. A LINHA TRACEJADA INDICA O VALOR DE CORTE.

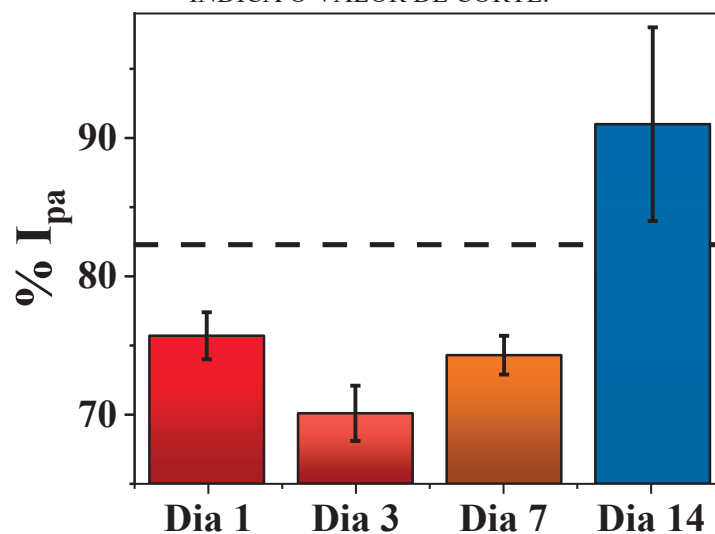


FONTE: A Autora (2022).

Pode-se observar que a resposta da amostra negativa ficou acima do valor de corte, assim como aquela obtida para Ab-FA. Por outro lado, as respostas para o controle positivo (Ab-RBD) e para a mistura (Ab-RBD + Ab-FA) apresentaram valores de $\%I_{pa}$ abaixo do valor de corte. Isso indica que não houve prejuízos à formação do imunocomplexo na superfície do eletrodo; ou seja, o método é seletivo e sensível ao analito, mesmo na presença de um interferente.

Para avaliar a estabilidade do imunossensor, a plataforma foi construída e armazenada a 4 °C por diferentes dias. Os resultados são apresentados na Figura 87.

FIGURA 87 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO IMUNOSSENSOR: MÉDIA DE % I_{pa} PARA AMOSTRAS DE SORO FORTIFICADAS COM ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA SARS-CoV-2 APÓS DIFERENTES DIAS DE ARMAZENAMENTO DO DISPOSITIVO. A LINHA TRACEJADA INDICA O VALOR DE CORTE.



FONTE: A Autora (2022).

Pode-se observar que apenas no dia 14 a resposta do imunossensor ficou acima do valor de corte. Portanto, o dispositivo pode ser armazenado por até 7 dias sem que ocorram perdas de sua performance. Este tempo de estabilidade está de acordo com os resultados previamente reportados na literatura para imunossensores eletroquímicos, baseados em plataformas modificadas com materiais carbonáceos, que objetivam a detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2, conforme pode ser visualizado na Tabela 15.

TABELA 15 – PLATAFORMA, TÉCNICA, TEMPO PARA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR, ESTABILIDADE E MENOR VALOR DETECTÁVEL PARA MÉTODOS ELETROQUÍMICOS DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SARS-CoV-2, BASEADOS EM PLATAFORMAS MODIFICADAS COM MATERIAIS CARBONÁCEOS

Plataforma	Técnica	Tempo para construção ^[1]	Estabilidade	Tempo de incubação	Menor valor detectável	Ref.
Substrato de poliimida + grafeno gravado a laser + S1	Amperometria	425 min	5 dias	10 min	5,0 ng mL ⁻¹ [2]	186
Micropilares de ouro impressos por 3D + óxido de grafeno reduzido + RBD ^[3]	EIE	480 min	N.R.	N.R.	16,9 fmol L ⁻¹	187
Baseada em papel + óxido de grafeno + RBD	SWV	150 min	14 dias	30 min	1,0 ng mL ⁻¹	188
SPE + biochar + RBD	DPV	90 min	7 dias	60 min	10,0 ng mL ⁻¹	Este estudo

[1] sem considerar o tempo para modificação do eletrodo;

[2] menor nível usado na construção da curva de calibração;

[3] dispositivo microfluídico.

DPV: voltametria de pulso diferencial (do inglês, *differential pulse voltammetry*); EIE: espectroscopia de impedância eletroquímica; N.R.: não reportado; SPE: eletrodo de carbono impresso (do inglês, *screen-printed carbon electrode*); SWV: voltametria de onda quadrada (do inglês, *square-wave voltammetry*)

FONTE: A Autora (2022).

Mesmo que o menor valor detectável do analito investigado neste estudo tenha sido relativamente maior do que aqueles até então reportados, o tempo para construção do imunossensor é o menor no presente caso. Sendo assim, mostrou-se a possibilidade de utilização de uma dispersão de biochar na imobilização de biomoléculas para o desenvolvimento de um imunossensor visando a detecção de anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2, obtendo-se parâmetros analíticos que evidenciam a adequabilidade da aplicação do dispositivo em amostras de soro comercial.

4.4.7 Conclusões Parciais

O biochar obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar empregando temperatura de pirólise de 700 °C e sem ativação química (BC700) foi o material mais adequado para a imobilização de uma biomolécula e construção de um imunossensor eletroquímico. Nesse sentido, uma dispersão do material foi utilizada para modificar um eletrodo de carbono impresso, sobre o qual a proteína RBD do vírus SARS-CoV-2 foi imobilizada, para posterior aplicação na detecção de anticorpos contra o vírus em amostras de soro fortificadas. O dispositivo foi capaz de diferenciar respostas positivas e negativas, baseado em um valor de corte de 82,3 %, em um nível de confiança de 95 %. A plataforma foi seletiva para a detecção do analito mesmo na presença de um interferente (anticorpos contra febre amarela) a pode ser armazenada por até 7 dias sem perdas na sua performance.

Ademais, destaca-se que o uso de imunossensores eletroquímicos é uma ferramenta promissora para superar as limitações de estratégias tradicionais usadas em laboratórios clínicos para a detecção de antígenos/anticorpos. O ensaio ELISA, por exemplo, é um método que consome um tempo relativamente longo que requer procedimentos laboratoriais intensivos, pessoal altamente habilitado e reagentes de alto custo, como biomoléculas marcadas. Por sua vez, testes baseados em imunocromatografia, como imunoensaios de fluxo lateral, possuem tamanho miniaturizado e portabilidade, mas geralmente apresentam problemas de sensibilidade e seletividade que resultam em resultados de falsos-negativos ou falsos-positivos. Considerando isso, os imunossensores eletroquímicos são plataformas que combinam a possibilidade de miniaturização - consequentemente reduzindo o volume de amostras e reagentes requeridos para as análises, diminuindo a geração de resíduos (bio)químicos – e o desenvolvimento de sistemas de detecção custo-efetivos, fornecendo determinações mais rápidas e baratas, altamente disponíveis para serem acessadas por toda a população.

CONCLUSÃO GERAL

O biochar foi produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar, empregando diferentes temperaturas finais de pirólise e um procedimento de ativação química. A partir da caracterização dos diferentes materiais, verificou-se a ocorrência de maior decomposição da matéria-prima ao se empregar maiores temperaturas, de modo que os materiais produzidos sob menores temperaturas continham quantidades mais elevadas de grupos superficiais, como grupos oxigenados. Além disso, observou-se que o procedimento de ativação resultou na oxidação e nitratação da estrutura carbonácea, o que resultou no aumento na quantidade de grupos funcionais na superfície dos materiais.

A potencialidade dos diferentes materiais como modificadores de eletrodos de pasta de carbono, visando pré-concentração espontânea, seguida de determinação voltamétrica, de íons Cu^{2+} foi, então, investigada. O material que forneceu resposta mais intensa foi BCA400, inferindo-se que a presença de uma quantidade considerável de grupos superficiais neste material favoreceu a interação com a espécie de interesse. A partir disso, desenvolveu-se um método, utilizando voltametria de pulso diferencial, para a determinação do analito em água de torneira, estimando-se parâmetros de validação adequados para a finalidade proposta e em concordância com o que estabelece a legislação vigente, isto é, a Portaria 888/2021 do Gabinete do Ministro do Ministério da Saúde (GM/MS).

O eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar contendo íons Cu^{2+} imobilizados foi utilizado, ainda, em uma abordagem de determinação indireta de creatinina. Para isso, investigou-se a supressão gerada no sinal voltamétrico do cobre, quando em contato com o analito, devido a formação de um complexo. Com isto, foi possível desenvolver um método para determinação de creatinina em urina sintética, obtendo-se também estimativas adequadas dos parâmetros de validação investigados, considerando a finalidade proposta.

Investigou-se, ainda, a possibilidade de utilização do biochar na imobilização de biomoléculas. Para isso, dispersões foram preparadas com os diferentes materiais e utilizadas na modificação de eletrodos de carbono impressos, sobre os quais a proteína RBD do vírus SARS-CoV-2 foi imobilizada, por meio de uma reação de ligação cruzada. O dispositivo foi, então, empregado para a determinação de anticorpos contra o vírus em amostras de soro e forneceu uma diferenciação qualitativa entre amostras positivas e negativas, mostrando, portanto, a viabilidade de utilização do biochar também para esta finalidade.

Sendo assim, percebe-se que o biochar é um material versátil, cujas propriedades e mecanismos de interação com espécies orgânicas, inorgânicas e biomoléculas podem ser explorados em diferentes abordagens de construção de sensores eletroquímicos. Ademais, o biochar é um material ambientalmente amigável e sua produção ajuda no gerenciamento de resíduos, uma característica chave para atender especialmente os objetivos 12 e 13 dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas.

REFERÊNCIAS

- 1 LEHMANN, J.; JOSEPH, S. **Biochar for Environmental management: Science and Technology**. Londres: Earthscan, 2009.
- 2 REZENDE, E. I. P.; ANGELO, L. C.; SANTOS, S. S.; MANGRICH, A. S. Biocarvão (biochar) e sequestro de carbono. **Revista Virtual de Química**, v.3, n.5, p.426-433, 2011.
- 3 The 17 Goals. **United Nations**. Disponível em: <<https://sdgs.un.org/goals#goals>>. Acesso em: 02 maio 2022.
- 4 NIAZI, N.K.; BIBI, I.; SHAHID, M.; OK, Y.S.; SHAREEN, S.M.; RINKLEBE, J.; WANG, H.; MURTAZA, B.; ISLAM, E.; NAWAZ, M. F.; LUTTGE, A. Arsenic removal by Japanese oak wood biochar in aqueous solutions and well water: investigating arsenic fate using integrated spectroscopic and microscopic techniques. **Science of the Total Environment**, v.621, p.1642-1651, 2018.
- 5 PEREIRA, R. C.; ARBESTAIN, M. C.; SUEIRO, M. V.; MACIÁ-AGULLÓ, J. A. Assessment of the surface chemistry of wood-derived biochars using wet chemistry, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. **Soil Research**, v.53, p.753-762, 2015.
- 6 JUNG, S.; PARK, Y.; KWON, E. E. Strategic use of biochar for CO₂ capture and sequestration. **Journal of CO₂ Utilization**, v.32, p.128-139, 2019.
- 7 KONCZAK, M.; OLESZCZUK, P.; RÓZYLO, K. Application of different carrying gases and ratio between sewage sludge and willow for engineered (smart) biochar production. **Journal of CO₂ Utilization**, v.29, p.20-28, 2019.
- 8 ZHANG, J.; SHAO, J.; JIN, Q.; LI, Z.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; ZHANG, S.; CHEN, H. Sludge-based biochar activation to enhance Pb(II) adsorption. **Fuel**, v.252, p.101-108, 2019.
- 9 SHEN, Z.; ZHANG, Y.; McMILLIAN, O.; JIN, F.; AL-TABBAA, A. Characteristics and mechanisms of nickel adsorption on biochars produced from wheat straw pellets and rice husk. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, p.12800-12819, 2017.
- 10 YANG, F.; ZHANG, S.; LI, H.; LI, S.; CHENG, K.; LI, J.; TSANG, D.C.W. Corn straw-derived biochar impregnated with α -FeOOH nanorods for highly effective copper removal. **Chemical Engineering Journal**, v.348, p.191-201, 2018.
- 11 NZIHO, A. **Handbook on Characterization of Biomass, Biowaste and Related By-Products**. Switzerland: Springer Nature, 2020.
- 12 COLLARD, F.; BLIN, J. A review of biomass constituents: mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.38, p.594-608, 2014.

- 13 RODRIGUES, G. S. S. C.; ROSS, J. L. S. **A Trajetória da Cana-de-Açúcar no Brasil: Perspectivas Geográfica, Histórica e Ambiental**. Uberlândia: Editora da Universidade de Uberlândia (EDUFU), 2020.
- 14 BENJAMIN, Y.; GEORGENS, J. F.; JOSHI, S. V. Comparison of chemical composition and calculated ethanol yields of sugarcane varieties harvested for two growing seasons. **Industrial Crops and Products**, v.58, p.133-141, 2014.
- 15 HAJIHA, H.; SAIN, M. The use of sugarcane bagasse fibers as reinforcements in composites. In: FARUK, O.; SAIN, M. **Biofiber Reinforcements in Composite Materials**. Woodhead Publishing, 2015. p.525-549.
- 16 **Árvore do Conhecimento – Cana-de-açúcar. Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html#:~:text=Baga%C3%A7o%3A%20res%C3%ADduo%20fibroso%20da%20extra%C3%A7%C3%A3o,por%20tonelada%20de%20cana%20processada.> Acesso em: 02 fev. 2021.
- 17 Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira – Cana-de-açúcar. Safra 2022/23 – 2º Levantamento. v.9, n.2, agosto/2022.
- 18 VERMA, D.; GOPE, P. C.; MAHESHWARI, M. K.; SHARMA, R. K. Bagasse fiber composites – a review. **Journal of Materials and Environmental Science**, v.3, n.6, p.1079-1092, 2012.
- 19 KHAN, A. Z.; KHAN, S.; AYAZ, T.; BRUSSEAU, M. L.; KHAN, M. A.; NEWAB, J.; MUHAMMAD, S. Popular wood and sugarcane bagasse biochars reduced uptake of chromium and lead by lettuce from mine-contaminated soil. **Environmental Pollution**, v.263, p.114446-, 2020.
- 20 NIE, C.; YANG, X.; NIAZI, N. K.; XU, X.; WEN, Y.; RINKLEBE, J.; OK, Y. S.; XU, S.; WANG, H. Impact of sugarcane bagasse-derived biochar on heavy metal availability and microbial activity: a field study. **Chemosphere**, v.200, p.274-282, 2018.
- 21 SILVA, M. R. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; SILVA, A. A.; OLIVEIRA, A. F.; OLIVEIRA, R. L.; AZEVEDO, M. M.; PEREIRA, G. A. M. Effect of the incorporation of sugarcane bagasse biochar in leaching and bioavailability of clomazone in soil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.30, n.11, p.2386-2394, 2019.
- 22 MA, Y.; QI, Y.; YANG, L.; WU, L.; LI, P.; GAO, F.; QI, X.; ZHANG, Z. Adsorptive removal of imidacloprid by potassium hydroxide activated magnetic sugarcane bagasse biochar: adsorption efficiency, mechanism and regeneration. **Journal of Cleaner Production**, v.292, p.126005-, 2021.
- 23 OLIVEIRA, F. R.; PATEL, A. K.; JAISI, D. P.; ADHIKARI, S.; LU, H.; KHANAL, S. K. Environmental application of biochar: current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v.246, p.110-122, 2017.
- 24 INYANG, M.; DICKENSON, E. The potential role of biochar in the removal of organic and microbial contaminants from potable and reuse water: a review. **Chemosphere**, v.134, p.232-240, 2015.

- 25 CARRIER, M.; HUGO, T.; GORGENS, J.; KNOETZE, H. Comparison of slow and vacuum pyrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.90, n.1, p.18-26, 2011.
- 26 SAJJADI, B.; CHEN, W.; EGIEBOR, N. O. A comprehensive review on physical activation of biochar for energy and environmental applications. **Reviews in Chemical Engineering**, 2018.
- 27 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**, v.161, p.670-676, 2009.
- 28 OLIVEIRA, G. A.; GEVAERD, A.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Biochar obtained from spent coffee grounds: evaluation of adsorption properties and its application in a voltammetric sensor lead (II) ions. **Microchemical Journal**, v.165, p.106114-, 2021.
- 29 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**, v.264, p.1-9, 2015.
- 30 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**, v.200-202, p.673-680, 2012.
- 31 LIU, P.; LIU, W.; JIANG, H.; CHEN, J.; LI, W.; YU, H. Modification of bio-char derived from fast pyrolysis of biomass and its application in removal of tetracycline from aqueous solution. **Bioresource Technology**, v.121, p.235-240, 2012.
- 32 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**, v.28, n.8, p.5119-5127, 2014.
- 33 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**, v.169, p.622-629, 2014.
- 34 WANG, J.; KASKEL, S. KOH activation of carbon-based materials for energy storage. **Journal of Materials Chemistry**, 2012.
- 35 SAJJADI, B.; ZUBATIUK, T.; LESZCZYNSKA, D.; LESZCZYNSKI, J.; CHEN, W. Y. Chemical activation of biochar for energy and environmental applications: a comprehensive review. **Reviews in Chemical Engineering**, 2018.
- 36 HUSSAIN, M.; FAROOQ, M.; NAWAZ, A.; AL-SADI, A. M.; SOLAIMAN, Z. M.; ALGHAMDI, S. S.; AMMARA, U.; OK, Y. S.; SIDDIQUE, K. H. M. Biochar for crop production: potential benefits and risks. **Journal of Soils and Sediments**, v.17, p.685-716, 2017.

37 JUNG, S.; PARK, Y.; KWON, E. E. Strategic use of biochar for CO₂ capture and sequestration. **Journal of CO₂ Utilization**, v.32, p.128-139, 2019.

38 INYANG, M. I.; GAO, B.; YAO, Y.; XUE, Y.; ZIMMERMAN, A.; MOSA, A.; PULLAMMANAPPALLIL, P.; OK, Y. S.; CAO, X. A review of biochar as a low-cost adsorbent for aqueous heavy metal removal. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.46, n.4, p.406-433, 2016.

39 CHENG, B.; ZENG, R. J.; JIANG, H. Recent developments of post-modification of biochar for electrochemical energy storage. **Bioresource Technology**, v.246, p.224-233, 2017.

40 KALINKE, C.; OLIVEIRA, P. R.; BONACIN, J. A.; JANEGITZ, B. C.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. State-of-the-art and perspectives in the use of biochar for electrochemical and electroanalytical applications. **Green Chemistry**, v.23, p.5272-, 2021.

41 SPANU, D.; BINDA, G.; DOSSI, C.; MONTICELLI, D. Biochar as an alternative sustainable platform for sensing applications: a review. **Microchemical Journal**, v.159, p.105506-, 2020.

42 ALMEIDA, L. S.; ORESTE, E. Q.; MACIEL, J. V.; HEINEMANN, M. G.; DIAS, D. Electrochemical devices obtained from biochar: advances in renewable and environmentally-friendly technologies applied to analytical chemistry. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v.26, p.e00089-, 2020.

43 EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2^a. Edição, 2014.

44 GUPTA, V. K.; JAIN, R.; RADHAPYARI, K.; JADON, N.; AGARWAL, S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals – A review. **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 2, p. 179-196, jan. 2011.

45 Pure&App. Chem., V.63, n.9, p.1247-1250, 1991.

46 ZHANG, Y.; WEI, Q. The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: a mini review. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.781, p-401-409, 2016.

47 ARINO, C.; SERRANO, N.; DÍAZ-CRUZ, J. M.; ESTEBAN, M. Voltammetric determination of metal ions beyond mercury electrodes. A review. **Analytica Chimica Acta**, v.990, n.16, p.11-53, 2017.

48 DHANJAI; SINHA, A.; LU, X.; WU, L.; TAN, D.; LI, Y.; CHEN, J.; JAIN, R. Voltammetric sensing of biomolecules at carbon based electrode interfaces: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v.98, p.174-189, 2018.

49 SHUFANG, R.; JUNLING, Z.; ZHIXIANG, Z.; HONGQIANG, S. Perspective and application of modified electrode material technology in electrochemical voltammetric sensors for analysis and detection of illicit drugs. **Sensors and Actuators A: Physical**, v.329, p.112821-, 2021.

- 50 ARDUINI, F.; MICHELI, L.; SCOGNAMIGLIO, V.; MAZZARACCHIO, V.; MOSCONE, D. Sustainable materials for the design of forefront printed (bio)sensors applied in agrifood sector. **Trends in Analytical Chemistry**, v.128, p.115909-, 2020.
- 51 XIAO, T.; HUANG, J.; WANG, D.; MENG, T.; YANG, X. Au and Au-based nanomaterials: synthesis and recent progress in electrochemical sensor applications. **Talanta**, v.206, p.120210-, 2020.
- 52 Pure&App. Chem., V.69, n.6, p.1317-1323, 1997.
- 53 SUGHIHIRO, T. M.; OLIVEIRA, P. R.; 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**, v.143, p.40-45, 2013.
- 54 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 Chemistry**, v.171, p.426-431, 2015.
- 55 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**, v.292, p.55-62, 2018.
- 56 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**, v.983, p.103-111, 2017.
- 57 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**, v.799, p.602-608, 2017.
- 58 KALINKE, C.; MOSCARDI, A. P. Z.; OLIVEIRA, P. R.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Simple and low-cost sensor based on activated biochar for the stripping voltammetric detection of caffeic acid. **Microchemical Journal**, v.159, p.105380-, 2020.
- 59 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**, v.142, p.221-227, 2015.
- 60 GEVAERD, A.; OLIVEIRA, P. R.; MANGRICH, A. S.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Evaluation of antimony microparticles supported on biochar for application in the voltammetric determination of paraquat. **Materials Science and Engineering C**, v.62, p.123-129, 2016.

- 61 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**, v.261, p.464-473, 2018.
- 62 QU, K.; HU, X.; LI, Q. Electrochemical environmental pollutant detection enabled by waste tangerine peel-derived biochar. **Diamond & Related Materials**, v.131, p.109617-, 2023.
- 63 ZOU, J.; QIAN, W.; LI, Y.; YU, Q.; YU, Y.; CHEN, S.; QU, F.; GAO, Y.; LU, L. Multilayer activated biochar/UiO-66-NH₂ film as intelligent sensing platform for ultra-sensitive electrochemical detection of Pb²⁺ and Hg²⁺. **Applied Surface Science**, v.569, p.151006-, 2021.
- 64 ATES, A.; OSKAY, K. O. Preparation and characterization of nanosized Fe₃O₄-biochar electrocatalysts with large surface area for H₂O₂ sensing. **Surfaces and Interfaces**, v.29, p.101733-, 2022.
- 65 CANCELLIERE, R.; CARBONE, K.; PAGANO, M.; CACCIOTTI, I.; MICHELI, L. Biochar from brewers' spent grain: a green and low-cost smart material to modify screen-printed electrodes. **Biosensors**, v.9, p.139-, 2019.
- 66 LIU, Y.; YAO, L.; HE, L.; LIU, N.; PIAO, Y. Electrochemical enzyme biosensor bearing biochar nanoparticle as signal enhancer for bisphenol A detection in water. **Sensors**, v.19, p.1619-, 2019.
- 67 HE, L.; YANG, Y.; KIM, J.; YAO, L.; DONG, X.; LI, T.; PIAO, Y. Multi-layered enzyme coating on highly conductive magnetic biochar nanoparticles for bisphenol A sensing in water. **Chemical Engineering Journal**, v.384, p.123276-, 2020.
- 68 MARTINS, G.; GOGOLA, J. L.; CAETANO, F. R.; KALINKE, C.; JORGE, T. R.; SANTOS, C. N. D.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Quick electrochemical immunoassay for hantavirus detection based on biochar platform. **Talanta**, v.204, p.163-171, 2019.
- 69 MURPHY, K.; WEAVER, C. **Janeways's Immunobiology**. 9^a Edição, CRC Press, 2016.
- 70 CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, 2010.
- 71 SELA-CULANG, I.; KUNIK, V. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Frontiers in Immunology**, v.4, p.1-13, 2013.
- 72 RADECKA, H.; RADECKI, J. Label-free electrochemical immunosensors for viruses and antibodies detection – Review. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v.59, p.269-275, 2016.
- 73 CARTER, L. J.; SMOOT, L. V.; LI, J. W.; ZHOU, Q.; SAVESON, C. J.; SASSO, J. M.; GREGG, A. C.; SOARES, D. J.; BESKID, T. R.; IERVEY, S. R.; LIU, C. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. **ACS Central Science**, v.6, p.591-605, 2020.

- 74 BERBENBROCK, J. A.; GRECCO-MACHADO, R.; ACHENBACH, S. Microfluidic devices for the detection of viruses: aspects of emergency fabrication during the COVID-19 pandemic and other outbreaks. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v.476, 2020.
- 75 LIU, Y.; ZHAN, L.; QIN, Z.; SACKRISON, J.; BISCHOF, J. C. Ultrasensitive and highly specific lateral flow assays for point-of-care diagnosis. **ACS Nano**, v.15, p.3593-3611, 2021.
- 76 LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v.314, n.1-2, p.1-26, 2001.
- 77 MARTINS, G. Construção e avaliação de imunossensores eletroquímicos em plataformas descartáveis visando diagnóstico e triagem de Hantavírus Araucária e SARS-CoV-2. 2022. 143 p. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – Paraná, 2022.
- 78 ATKINS, P.W.; JONES, Loretta. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3ª Edição, Porto Alegre: Bookman, 2006.
- 79 TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.57, p.386-398, 2003.
- 80 COSTA, L. S. A.; PEGLER, S. P.; LELLIS, R. F.; KREBS, V. L. J.; ROBERTSON, S.; MORGAN, T.; HONJO, R. S.; BERTOLA, D. R.; KIM, C. A. Menkes disease: importance of diagnosis with molecular analysis in the neonatal period. **Revista da Associação Médica Brasileira**, n.61, n.5, p.407-410, 2015.
- 81 Copper in Drinking Water. Committee on Copper in Drinking Water, National Research Council. ISBN: 0-309-59406-5, 162p. 2000.
- 82 Wilson Disease. **National Library of Medicine**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441990/>>. Acesso em: 02 jan. 2023.
- 83 Water Sanitation and Health – Copper. **World Health Organization**. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/water-sanitation-and-health/chemical-hazards-in-drinking-water/copper>>. Acesso em 02 jan. 2023
- 84 Copper in drinking water: guideline technical document for consultation. **Government of Canada**. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/health-canada/programs/consultation-on-copper-drinking-water/document.html#4.1>>. Acesso em 02 jan. 2023.
- 85 Cobre. **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2022/02/Cobre.pdf>>. Acesso em 02 jan. 2022.
- 86 PORTARIA GM/MS N° 888, DE 4 DE MAIO DE 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS n° 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2021.

- 87 LI, Q.; ZHUO, Y.; YOU, S.; ZHANG, Y.; ZHAO, B.; XU, L. Rapid preparation of melamine based magnetic covalent triazine polymers for highly efficient extraction of copper (II), chromium(III) and lead (II) ions from environmental and biological samples. **Microchemical Journal**, v.181, p.107698-, 2022.
- 88 OZBEK, N.; BAYSAL, A. The miniaturized solid phase extraction of some trace metals using graphene nanoplatelets by GFAAS. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 2018.
- 89 RANJBAR, L.; YAMINI, Y.; SALEH, A.; SEIDI, S.; FARAJI, M. Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction combined with ICP-OES for the determination of trace quantities of cobalt, copper, manganese, nickel and zinc in environmental water samples. **Microchimica Acta**, v.177, p.119-127, 2012.
- 90 SHOAEE, H.; ROSHDI, M.; KHANLARZADEH, N.; BEIRAGHI, A. Simultaneous preconcentration of copper and mercury in water samples by cloud point extraction and their determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.98, p.70-75, 2012.
- 91 XING, G.; SARDAR, M. R.; LIN, B.; LIN, J. Analysis of trace metals in water samples using NOBIAS chelate resins by HPLC and ICP-MS. **Talanta**, v.204, p.50-56, 2019.
- 92 HABILA, M. A.; ALOTHMAN, Z. A.; EL-TONI, A. M.; LABIS, J. P.; LI, X.; ZHANG, F.; SOYLAK, M. Mercaptobenzothiazole-functionalized magnetic carbon nanospheres of type Fe₃O₄@SiO₂@C for the preconcentration of nickel, copper and lead prior to their determination by ICP-MS. **Microchimica Acta**, v.183, p.2377-2384, 2016.
- 93 ZHANG, W.; WEI, J.; ZHU, H.; ZHANG, K.; MA, F.; MEI, Q.; ZHANG, Z.; WANG, S. Self-assembled multilayer of alkyl graphene oxide for highly selective detection of copper (II) based on anodic stripping voltammetry. **Journal of Materials Chemistry**, v.22, p.22631-, 2012.
- 94 SULLIVAN, C.; LU, D.; BRACK, E.; DREW, C.; KURUP, P. Voltammetric codetection of arsenic(III) and copper(II) in alkaline buffering system with gold nanostar modified electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v.1107, p.63-73, 2020.
- 95 BERRABAH, S. E.; BENCHETTARA, A.; SMAILI, F.; TABTI, S.; BENCHETTARA, A. Electrodeposition of zinc hydroxide on carbon graphite electrode for electrochemical determination of trace copper in water samples using square wave anodic stripping voltammetry. **Materials Chemistry and Physics**, v.278, p.125670-, 2022.
- 96 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**, v.318, p.526-532, 2016.
- 97 KALINKE, C.; OLIVEIRA, P. R. P.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Chemically-activated biochar from *Ricinus communis* L. cake and their potential applications for the voltammetric assessment of some relevant

environmental pollutants. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.31, n.5, p.941-952, 2020.

98 KASHANI, K.; ROSNER, M. H.; OSTERMANN, M. Creatinine: from physiology to clinical application. **European Journal of Internal Medicine**, v.72, p.9-14, 2020.

99 NARAYANAN, S.; APPLETON, H. D. Creatinine: a review. **Clinical Chemistry**, v.26, n.8, p.1119-1126, 1980.

100 ARNDT, T. Urine-creatinine concentration as a marker of urine dilution: reflections using a cohort of 45,000 samples. **Forensic Science International**, v.186, p.48-51, 2009.

101 RAVEENDRAN, J.; RESMI, P. E.; REMACHANDRAN, T.; NAIR, B. G.; BABU, T. G. S. Fabrication of a disposable non-enzymatic electrochemical creatinine sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.243, p.589-595, 2017.

102 NARIMANI, R.; ESMAELI, M.; RASTA, S. H.; KHOSROSHAHI, H. T.; MOBED, A. Trend in creatinine determining methods: conventional methods to molecular-based methods. **Analytical Science Advances**, v.2, p.308-325, 2021.

103 PARONI, R.; FERMO, I.; CIGHETTI, G.; FERRERO, C. A.; CAROBENE, A.; CERIOTTI, F. Creatinine determination in serum by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.25, p.463-468, 2004.

104 CIESLAROVA, Z.; MAGALDI, M.; BARROS, L. A.; LAGO, C. L.; OLIVEIRA, D. R.; FONSECA, F. A. H.; IZAR, M. C.; LOPES, A. S.; TAVARES, M. F. M.; KLASSEN, A. Capillary electrophoresis with dual diode array detection and tandem mass spectrometry to access cardiovascular biomarkers candidates in human urine: trimethylamine-N-oxide and L-carnitine. **Journal of Chromatography A**, v.1583, p.136-142, 2019.

105 HARLAN, R.; CLARKE, W.; BUSSOLO, J. M.; KOSAK, M.; STRASESKI, J.; MEANY, D. L. An automated turbulent flow liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry (LC-IDMS) method for quantitation of serum creatinine. **Clinica Chimica Acta**, v.411, p.1728-1734, 2010.

106 FERNÁNDEZ, M. F.; GONZÁLEZ, P. R.; ÁLVAREZ, E. A.; RODRÍGUEZ, F.; MENÉNDEZ, F. V. A.; ALONSO, J. I. G. Simultaneous determination of creatinine and creatine in human serum by double-spike isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Analytical Chemistry**, v.87, p.3755-3763, 2015.

107 TSIKAS, D.; WOLF, A.; FRÖLICH, J. C. Simplified HPLC method for urinary and circulating creatinine. **Clinical Chemistry**, v.50, n.1, 2004.

108 SUN, N.; LI, Q.; ZHAO, L.; HE, H.; ZHANG, M.; WANG, X. Simultaneous quantitative analysis of phosphocreatine, creatine and creatinine in plasma of children by HPLC-MS/MS method: application to a pharmacokinetic study in children with viral myocarditis. **Biomedical Chromatography**, v.33, p.e4558-, 2019.

- 109 RANDVIIR, E. P.; KAMPOURIS, D. K.; BANKS, C. E. An improved electrochemical creatinine detection method via a Jaffe-based procedure. **Analytst**, v.138, p.6565-, 2013.
- 110 HOOSHMAND, S.; ES'HAGHI, Z. Microfabricated disposable nanosensor based on CdSe quantum dot/ionic liquid-mediated hollow fiber-pencil graphite electrode for simultaneous electrochemical quantification of uric acid and creatinine in human samples. **Analytica Chimica Acta**, v.972, p.28-37, 2017.
- 111 RAO, H.; LU, Z.; GE, H.; LIU, X.; CHEN, B.; ZOU, P.; WANG, X.; HE, H.; ZENG, X.; WANG, Y. Electrochemical creatinine sensor based on a glassy carbon electrode modified with a molecularly imprinted polymer and a Ni@polyaniline nanocomposite. **Microchimica Acta**, v.184, p.261-269, 2017.
- 112 CROCKER, H.; SHEPHARD, M. D. S.; WHITE, G. H. Evaluation of an enzymatic method for determining creatinine in plasma. **Journal of Clinical Pathology**, v.41, p.576-581, 1988.
- 113 JUNGE, W.; WILKE, B.; HALABI, A.; KLEIN, G. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. **Clinica Chimica Acta**, v.344, p.137-148, 2004.
- 114 PUNDIR, C. S.; KUMAR, P.; JAIWAL, R. Biosensing methods for determination of creatinine: a review. **Biosensors and Bioelectronics**, v.126, p.707-724, 2019.
- 115 SILVA, L. R. G.; STEFANO, J. S.; ORZARI, L. O.; BRAZACA, L. C.; CARRILHO, E.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F.; MUNOZ, R. A. A.; JANEGITZ, B. C. Electrochemical biosensor for SARS-CoV-2 cDNA detection using AuPs, modified 3D-printed graphene electrodes. **Biosensors**, v.12, p.622-, 2022.
- 116 FAVA, E. L.; PRADO, T. M.; GARCIA-FILHO, A.; SILVA, T. A.; CINCOTTO, F. H.; MORAES, F. C.; FARIA, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Non-enzymatic electrochemical determination of creatinine using a novel screen-printed microcell. **Talanta**, v.207, p.120277-, 2020.
- 117 PANDEY, I.; BAIRAGI, P. K.; VERMA, N. Electrochemically grown polymethylene blue nanofilm on copper-carbon nanofiber nanocomposite: an electrochemical sensor for creatine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.277, p.562-570, 2018.
- 118 GAO, X.; GUI, R.; GUO, H.; WANG, Z.; LIU, Q. Creatinine-induced specific signal responses and enzymeless ratiometric electrochemical detection based on copper nanoparticles electrodeposited on reduced graphene oxide-based hybrids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.285, p.201-208, 2019.
- 119 Histórico da Pandemia de COVID-19. **Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: < <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19#:~:text=Em%2031%20de%20dezembro%20de,identificada%20antes%20em%20seres%20humanos.>>. Acesso em 11 jan. 2023.
- 120 Folha Informativa sobre COVID-19. **Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: < <https://www.paho.org/pt/covid19>>. Acesso em 11 jan. 2023.

- 121 HASOKSUZ, M.; KILIC, S.; SARAC, F. Coronaviruses and SARS-CoV-2. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v.50, p.549-556, 2020.
- 122 JACKSON, C. B.; FARZAN, M.; CHEN, B.; CHOE, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews – Molecular Cell Biology**, v.23, 2022.
- 123 HUANG, Y.; YANG, X.; XU, W.; LIU, S. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.41, p.1141-1149, 2020.
- 124 YUCE, M.; FILIZTEKIN, E.; OZKAYA, K. G. COVID-19 diagnosis – a review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v.172, p.112752-, 2021.
- 125 BALKOURANI, G.; BROUZGOU, A.; ARCHONTI, M.; PAPANDRIANOS, N.; SONG, S.; TSIAKARAS, P. Emerging materials for the electrochemical detection of COVID-19. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.893, p.115289-, 2021.
- 126 MAHSHID, S. S.; FLYNN, S. E.; MAHSHID, S. The potential application of electrochemical biosensors in the COVID-19 pandemic: a perspective on the rapid diagnostics of SARS-CoV-2. **Biosensors and Bioelectronics**, v.176, p.112905-, 2021.
- 127 KOTRU, S.; KLIMUNTOWSKI, M.; RIDHA, H.; UDDIN, Z.; ASKHAR, A. A.; SINGH, G.; HOWLADER, M. M. R. Electrochemical sensing: a prognostic tool in the fight against COVID-19. **Trends in Analytical Chemistry**, v.136, p.116198-, 2021.
- 128 CREECH, C. B.; WALKER, S. C.; SAMUELS, R. J. SARS-CoV-2 vaccines. **Clinical Review & Education**, v.325, n.13, 2021.
- 129 QI, H.; LIU, B.; WANG, X.; ZHANG, L. The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. **Nature Immunology**, v.23, p.1008-1020, 2022.
- 130 LEW, T. T. S.; AUNG, K. M. M.; OW, S. Y.; AMRUN, S. N.; SUTARLIE, L.; NG, L. F. P.; SU, X. Epitope functionalized gold nanoparticles for rapid and selective detection of SARS-CoV-2 IgG antibodies. **ACS Nano**, v.15, p.12286-12297, 2021.
- 131 IMRAN, S.; AHMADI, S.; KERMAN, K. Electrochemical biosensor for the detection of SARS-CoV-2 and other viruses. **Micromachines**, v.12, p.1-21, 2021.
- 132 ZHU, F.; ALTHAUS, T.; TAN, C. W.; COSTANTINI, A.; CHIA, W. N.; CHAU, N. V. V.; TAN, L. V.; MATTIUZO, G.; ROSE, N. J.; VOIGLIO, E.; WANG, L. WHO international standard for SARS-CoV-2 antibodies to determine markers of protection. **The Lancet**, 2022.
- 133 BOEHM, H.P. Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons. **Carbon**, v. 32, n. 5, p. 759–769, 1994.
- 134 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos – DOQ-CGCRE-008 – Revisão 09, 2020.

- 135 BACCARIN, M.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Comparative performance of a bare graphite-polyurethane composite electrode unmodified and modified with graphene and carbon nanotubes in the electrochemical determination of escitalopram. **Talanta**, v.178, p.1024-1032, 2018.
- 136 BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; TORMEN, L.; CURTIUS, A. J.; BARBOSA-JÚNIOR, F. Reference concentrations for trace elements in urine for the Brazilian population based on q-ICO-MS with a simple dilute-and-shoot procedure. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.8, p.1406-1413, 2009.
- 137 BRAZ, B. A.; SANTIANI, M. H.; MARTINS, G.; PINTO, C. S.; ZARBIN, A. J.; BEIRÃO, B. C. B.; THOMAZ-SOCCOL, V.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H.; SOCCOL, C. R. Graphene-binding peptide in fusion with SARS-CoV-2 antigen for electrochemical immunosensor construction. **Biosensors**, v.12, n.10, p.885-, 2022.
- 138 MARTINS, G.; GOGOLA, J. L.; BUDNI, L. H.; PAPI, M. A.; BOM, M. A. T.; BUDEL, M. L. T.; SOUZA, E. M.; MULLER-SANTOS, M.; BEIRÃO, B. C. B.; BANKS, C. E.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Novel approach based on GQD-PHB as anchoring platform for the development of SARS-CoV-2 electrochemical immunosensor. **Analytica Chimica Acta**, v.1232, p.340442-, 2022.
- 139 LIN, B.; CHEN, W. Sugarcane bagasse pyrolysis in a carbon dioxide atmosphere with conventional and microwave-assisted heating. **Frontiers in Energy Research**, v.3, 2015.
- 140 SCHULTZ, J.; CAPOBIANCO, G.; VEIGA, P. A. S.; FORNARI, M. R.; ANTONANGELO, A. R.; TEBCHERANI, S. M.; MANGRICH, A. S.; PIANARO, S. A. Sustainable activated carbon obtained as a by-product of the sugar and alcohol industry for removal of amoxicillin from aqueous solution. **Energy, Ecology and Environment**, 2020.
- 141 TANG, L.; XIAO, J.; MAO, Q.; ZHANG, Z.; YAO, Z.; ZHU, X.; YE, S.; ZHONG, Q. Thermogravimetric analysis of the combustion characteristics and combustion kinetics of coals subjected to different chemical demineralization processes. **ACS Omega**, v.7, p.13998-14008, 2022.
- 142 PIETRZAK, R.; WACHOWSKA, H. Thermal analysis of oxidized coals. **Thermochimica Acta**, v.419, p.247-251, 2004.
- 143 VEIGA, P. A. S.; CERQUEIRA, M. H.; GONÇALVES, M. G.; MATOS, T. T. S.; PANTANO, G.; SCHULTZ, J.; ANDRADE, J. B.; MANGRICH, A. S. Upgrading from batch to continuous flow process for the pyrolysis of sugarcane bagasse: structural characterization of the biochars produced. **Journal of Environmental Management**, v.285, p.112145-, 2021.
- 144 BATISTA, E. M. C. C.; SCHULTZ, J.; MATOS, T. T.; FORNARI, M. R.; FERREIRA, T. M.; SZPOGANICZ, B.; 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**, v.8, p.10677-, 2018.
- 145 DONG, J.; WU, Y.; WANG, C.; LU, H.; LI, Y. Three-dimensional electrodes enhance electricity generation and nitrogen removal of microbial fuel cells. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2020.

- 146 WU, C.; HUANG, L.; XUE, S.; HUANG, Y.; HARTLEY, W.; CUI, M.; WONG, M. Arsenic sorption by red mud-modified biochar produced from rice straw. **Environmental Science and Pollution Research**, 2017.
- 147 VIJAYARAGHAVAN, K. The importance of mineral ingredients in biochar production, properties and application. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 2020.
- 148 CHEN, Y.; YANG, H.; WANG, X.; ZHANG, S.; CHEN, H. Biomass-based pyrolytic polygeneration system on cotton stalk pyrolysis: influence of temperature. **Bioresource Technology**, v.107, p.411-418, 2012.
- 149 GHANI, W. A. W. A. K.; MOHD, A.; SILVA, G.; BACHMANN, R. T.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; RASHID, U.; AL-MUHTASEB, A. H. Biochar production from waste rubber-wood-sawdust and its potential use in C sequestration: chemical and physical characterization. **Industrial Crops and Products**, v.44, p.18-24, 2013.
- 150 TERNERO-HIDALGO, J. J.; ROSAS, J. M.; PALOMO, J.; VALERO-ROMERO, M. J.; RODRÍGUEZ-MIRASOL, J.; CORDERO, T. Functionalization of activated carbons by HNO₃ treatment: influence of phosphorous surface groups. **Carbon**, v.101, p.409-419, 2016.
- 151 VINKE, P.; VAN DER EUK, M.; VERBREE, M.; VOSKAMP, A. F.; VAN BEKKUM, H. Modification of the surface of a gas-activated carbon and a chemically activated carbon with nitric acid, hypochlorite, and ammonia. **Carbon**, v.32, n.4, p.675-686, 1994.
- 152 MUKHERJEE, A.; ZIMMERMAN, A. R.; HARRIS, W. Surface chemistry variations among a series of laboratory-produced biochars. **Geoderma**, v.163, p.246-255, 2011.
- 153 SULIMAN, W.; HARSH, J. B.; ABU-LAIL, N. I.; FORTUNA, A.; DALLMEYER, I.; GÁRCIA-PEREZ, M. Influence of feedstock source and pyrolysis temperature on biochar bulk and surface properties. **Biomass and Bioenergy**, v.84, p.37-48, 2016.
- 154 LUPOI, J. S.; GJERSING, E.; DAVIS, M. F. Evaluating lignocellulosic biomass, its derivatives, and downstream products with Raman spectroscopy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.3, 2015.
- 155 ALVES, A. P. P.; OLIVEIRA, L. P. Z.; CASTRO, A. A. N.; NEUMANN, R.; OLIVEIRA, L. F. C.; EDWARDS, H. G. M.; SANT'ANNA, A. C. The structure of different cellulosic fibers characterized by Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v.86, p.324-330, 2016.
- 156 SHAHI, N.; MIN, B.; SAPKOTA, B.; RANGARI, V. K. Eco-friendly cellulose nanofiber extraction from sugarcane bagasse and film fabrication. **Sustainability**, v.12, p.6015-, 2020.
- 157 FERRARI, A. C.; ROBERTSON, J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon. **Physical Reviews B**, v.61, n.20, p.14095-14107, 2000.

- 158 REN, N.; TANG, Y.; LI, M. Mineral additive enhanced carbon retention and stabilization in sewage sludge-derived biochar. **Process Safety and Environmental Protection**, v.115, p.70-78, 2018.
- 159 MENDONÇA, F. G.; CUNHA, I. T.; SOARES, R. R.; TRISTÃO, J. C.; LAGO, R. M. Tuning the surface properties of biochar by thermal treatment. **Bioresource Technology**, v.246, p.28-33, 2017.
- 160 NAHATA, M.; SEO, C. Y.; KRISHNAKUAR, P.; SCHWANK, J. New approaches to water purification for resource-constrained settings: production of activated biochar by chemical activation with diammonium hydrogenphosphate. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, 2017.
- 161 YANG, F.; AFZAL, W.; CHENG, K.; LIU, N.; PAULY, M.; BELL, A. T.; LIU, Z.; PRAUSNITZ, J. M. Nitric-acid hydrolysis of *Miscanthus giganteus* to sugars fermented to bioethanol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.20, p.304-314, 2015.
- 162 SANTOS, F.; EICHLER, P.; QUEIROZ, J. H.; GOMES, F. Production of second-generation ethanol from sugarcane. In: SANTOS, F.; RABELO, S. C.; MATOS, M.; EICHLER, P. **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**. Academic Press, 2020. p.195-228.
- 163 BECKENDORF, A.; LAMP, A.; KALTSCHMITT, M. Optimization of hydrolysis conditions for xylans and straw hydrolysates by HPLC analysis. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021.
- 164 NEUMANN, C. C. M.; LABORDA, E.; TSCHULIK, K.; WARD, K. R.; COMPTON, R. G. Performance of silver nanoparticles in the catalysis of the oxygen reduction reaction in neutral media: efficiency limitation due to hydrogen peroxide escape. **Nano Research**, v.6, n.7, p.511-524, 2013.
- 165 SHIMIZU, K.; SEPUNARU, L.; COMPTON, R. G. Innovative catalysts design for the oxygen reduction reaction for fuel cells. **Chemical Science**, 2016.
- 166 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2a.ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- 167 WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 2ª edição, New Jersey: Wiley-VCH, 2000.
- 168 SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.
- 169 FRISTAK, V.; PIPISKA, M.; LESNY, J.; SOJA, G.; FRIESL-HANL, W.; PACKOVÁ, A. Utilization of biochar sorbents for Cd²⁺, Zn²⁺, and Cu²⁺ ions separation from aqueous solutions: comparative study. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.187, p.4093-, 2015.
- 170 Skoog, D. A. et al. Fundamentos de Química Analítica. Editora Thomson, São Paulo – SP, 8ª Ed., 2006.

- 171 WANG, J.; BAN, H.; TENG, X.; WANG, H.; LADWIG, K. Impacts of pH and ammonia on the leaching of Cu(II) and Cd(II) from coal fly ash. **Chemosphere**, v.64, p.1892-1898, 2006.
- 172 MESQUITA, J.P.; MARTELLI, P. B.; GORGULHO, H. F. Characterization of copper adsorption on oxidized activated carbon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, n.6, p.1133-1143, 2006.
- 173 BINIAK, S.; PAKULA, M.; DARLEWSKI, W.; SWIATKOWSKI, A.; KULA, P. Powdered activated carbon and carbon paste electrodes: comparison of electrochemical behavior. **Journal of Applied Electrochemistry**, v.39, p.593-600, 2009.
- 174 FLORES-ÁLVAREZ, J. M.; CORTÉS-ARRIAGADA, D.; REYES-GÓMEZ, J.; GÓMEZ-SANDOVAL, Z.; MONTES, J. C. R.; PINEDA-URBINA, K. 2-Mercaptobenzothiazole modified carbon paste electrode as a novel copper sensor: an electrochemical and computational study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.888, p.115208-, 2021.
- 175 EL-RAHEEM, H. A.; HASSAN, R. Y. A.; KHALED, R.; FARGHALI, A.; EL-SHERBINY, I. M. Polyurethane-doped platinum nanoparticles modified carbon paste electrode for the sensitive and selective voltammetric determination of free copper ions in biological samples. **Microchemical Journal**, v.155, p.104765-, 2020.
- 176 HERMOUCHE, L.; AQIL, Y.; ABBI, K.; HAMDOUNI, Y. E.; OUANJI, F.; HAJJAJI, S. E.; MAHI, M. E.; LOTFI, E. M.; LABJAR, N. Eco-friendly modified carbon paste electrode by *Bigarreau Burlat* kernel shells for simultaneous trace detection of cadmium, lead, and copper. **Chemical Data Collections**, v.32, p.100642-, 2021.
- 177 MOYO, M.; OKONKWO, J. O.; AGYEI, N. M. Maize tassel-modified carbon paste electrode for voltammetric determination of Cu(II). **Environmental Monitoring and Assessment**, v.186, p.4807-4817, 2014.
- 178 The University of Rhode Island. Formation Constants for Complex Ions at 25 °C. Disponível em: <<https://www.chm.uri.edu/weuler/chm112/refmater/Kftable.html>>. Acesso em 15 dez. 2021.
- 179 NGAMCHUEUA, K.; WANNAPAIBOON, S.; NONGKHUNSAN, P.; HIRUNSIT, P.; FONGKAEW, I. Structural and electrochemical analysis of copper-creatinine complexes: application in creatinine detection. **Journal of the Electrochemical Society**, v.169, p.20567-, 2022.
- 180 FEKRY, A. M.; ABDEL-GAWARD, S. A.; TAMMAM, R. H.; ZAYED, M. A. An electrochemical sensor for creatinine based on carbon nanotubes/folic acid/silver nanoparticles modified electrode. **Measurement**, v.163, p.107958-, 2020.
- 181 PONNAIAH, S. K.; PERIAKARUPPAN, P. Carbon dots doped tungstic anhydride on graphene oxide nanopanels: a new picomolar-range creatinine selective enzymeless electrochemical sensor. **Materials Science & Engineering C**, v.113, p.111010-, 2020.
- 182 JEYACHANDRAN, Y. L.; MIELCZARSKI, J. A.; MIELCZARSKI, E.; RAI, B. Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on

hydrophobic and hydrophilic surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.341, p.136-142, 2010.

183 ROSS, G. M. S.; FILIPPINI, D.; NIELEN, M. W. F.; SALENTIJN, G. I. J. Unraveling the hook effect: a comprehensive study of high antigen concentration effects in sandwich lateral flow immunoassays. **Analytical Chemistry**, v.92, p.15587-15595, 2020.

184 GOGOLA, J. L.; MARTINS, G.; CAETANO, F. R.; RICCIARDI-JORGE, T.; SANTOS, C. N. D.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Label-free electrochemical immunosensor for quick detection of anti-hantavirus antibody. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.842, p.140-145, 2019.

185 SANTOS, C. S.; MOSSANHA, R.; WONRATH, K.; INABA, J.; PESSÔA, C. A.; SANTOS, C. S. Electrochemical immunosensor for qualitative diagnosis of the American Trypanosomiasis based on gold modified with 3-mercaptopropionic. **Journal of the Electrochemistry Society**, v.163, p.B158-B162, 2016.

186 TORRENTE-RODRÍGUEZ, R. M.; LIKAS, H.; TU, J.; MIN, J.; YANG, Y.; XU, C.; ROSSITER, H. B.; GAO, W. SARS-CoV-2 rapidplex: a graphene-based multiplexed telemedicine platform for rapid and low-cost COVID-19 diagnosis and monitoring. **Matter**, v.3, p.1981-, 2020.

187 ALI, A.; HU, C.; JAHAN, S.; YUAN, B.; SALEH, M. S.; JU, E.; GAO, S.; PANAT, R. Sensing of COVID-19 antibodies in seconds via aerosol jet nanoprinted reduced-graphene-oxide coated 3D electrodes. **Advanced Materials**, v.33, p.2006647-, 2021.

188 YAKOH, A.; PIMPITAK, U.; RENGPIPAT, S.; HIRANKARN, N.; CHAILAPAKUL, O.; CHAIYO, S. Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. **Biosensors & Bioelectronics**, v.176, p.112912-, 2021.

APÊNDICE 1 – INFORMAÇÕES ACADÊMICAS: DISCIPLINAS CURSADAS E CONCEITOS

1º SEMESTRE/2020

- QUIM-7025: QUÍMICA AMBIENTAL. Conceito: A;
- QUIM-7017: MÉTODOS ANALÍTICOS DE SEPARAÇÃO. Conceito: A.

2º SEMESTRE/2020

- QUIM-7038: SEMINÁRIOS D1. Conceito: A;
- QUIM-7046: TÓPICOS ESPECIAIS EM QUÍMICA II – PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE ELEMENTAR. Conceito: B;
- QUIM-7001: CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA EM QUÍMICA ANALÍTICA. Conceito: B.

1º SEMESTRE/2021

- QUIM-7016: MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS À DETERMINAÇÃO DE TRAÇOS. Conceito: A;
- QUIM-7039: SEMINÁRIOS D2. Conceito: A.

2º SEMESTRE/2021

- QUIM-7024: PRÁTICA DE DOCÊNCIA EM QUÍMICA. Conceito: A.

APÊNDICE 2 – PRODUÇÃO ACADÊMICA

Artigos Científicos

- VALENGA, M. G. P.; MARTINS, G.; MARTINS, T. A. C.; DIDEK, L. K.; GEVAERD, A.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Biochar: an environmentally-friendly material for construction of a SARS-CoV-2 electrochemical immunosensor. **Science of the Total Environment**, v.858, p.159797-, 2023.
- BRAZ, B. A.; HOSPINAL-SANTIANI, M.; MARTINS, G.; GOGOLA, J. L.; VALENGA, M. G. P.; BEIRÃO, B. C. B.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. Gold-binding peptide as a selective layer for electrochemical detection of SARS-CoV-2 antibodies. **Talanta**, v.257, p.124348-, 2023.

Capítulo de Livros

- CAETANO, F. R.; VALENGA, M. G. P.; LIMA, D.; JANEGITZ, B. C.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H. Microfluidic devices with electrochemical detection towards COVID-19 detection. In: CRESPILO, F. N. **COVID-19 Metabolomics and Diagnosis**, p.21-39, Springer, 2023.

Apresentação de Trabalhos

- VALENGA, M. G. P.; GEVAERD, A.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Sugarcane bagasse biochar: an ecofriendly material for construction of an electrochemical sensor for copper determination in tap water. **LatinXChem Twitter Conference 2022**, 2022.