



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Botucatu



**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPOSITIVO
ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE COBRE
SUPORTADAS SOBRE GRAFENO PARA DETECÇÃO DO
HERBICIDA GLIFOSATO**

SARAH SETZNAGL

Botucatu - SP
2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Botucatu



SARAH SETZNAGL

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPOSITIVO
ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE COBRE
SUPORTADAS SOBRE GRAFENO PARA DETECÇÃO DO
HERBICIDA GLIFOSATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Cesarino

Botucatu - SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Setznagl, Sarah.

Desenvolvimento e caracterização de dispositivo eletroquímico baseado em nanopartículas de cobre suportadas sobre grafeno para detecção do herbicida glifosato / Sarah Setznagl. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ivana Cesarino

Capes: 10604030

1. Glifosato. 2. Grafeno. 3. Nanopartículas. 4. Cobre.

Palavras-chave: Eletroanalítica; Glifosato; Grafeno; Nanopartículas de cobre.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE SARAH SETZNAGL,
DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.**

Aos 25 dias do mês de abril do ano de 2018, às 14:00 horas, no(a) Sala de Pós-Graduação do IBB, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. IVANA CESARINO - Orientador(a) do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP, Profa. Dra. CARLA DOS SANTOS RICCARDI do(a) Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI do(a) Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de SARAH SETZNAGL, intitulada **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE COBRE SUPORTADAS SOBRE GRAFENO PARA DETECÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dra. IVANA CESARINO

Carla Riccardi
Prof.ª. Dra. CARLA DOS SANTOS RICCARDI

Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à professora Valéria Sandrim, que foi quem me inspirou e incentivou a iniciar este trabalho, bem como o viabilizou.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Gisele, à minha prima Marília, ao Henrique e todos os meus amigos por me apoiarem e incentivarem durante a execução deste trabalho.

À professora Ivana Cesarino, pela compreensão, paciência e competência ao me orientar durante este trabalho.

A toda equipe do CEATOX pela colaboração e suporte.

À equipe do Departamento de Bioprocessos e do Laboratório de Eletroanalítica e Nanotecnologia, em nome do Martin Leme, pelo suporte, cooperação e ensinamentos.

Ao Instituto de Biociências e ao Programa de Pós-Graduação pelo suporte.

Aos amigos que me acompanharam e cooperaram ao longo do curso, em especial Bertha Gastelbondo, Caruane Alves e Adrielli Silva.

Aos professores João Pessoa Araújo Junior, Paulo Ribolla, Willian Zambuzzi, Daniela Carvalho dos Santos, Luciana Fleury, Valber Pedrosa, Sônia M. A. Jorge, Margarida Saeki e Rodrigo E. Barreto por todos os ensinamentos nas disciplinas que ministraram.

Ao Laboratório de Microscopia Avançada do Instituto de Química da UNESP (câmpus de Araraquara) pelas análises de caracterização de nanomateriais integrantes deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2015/02136-2) pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

George Bernard Shaw

RESUMO

O glifosato é o agrotóxico mais usado no mundo e atualmente é detectado em amostras por métodos cromatográficos. A fim de contribuir com as limitações desta técnica, este trabalho apresenta uma nova alternativa para a análise deste pesticida através de uma técnica eletroanalítica. Trata-se de uma molécula não eletroativa e que, portanto, não é detectada voltametricamente com sua estrutura básica, seja na forma molecular ou iônica. No entanto, é possível detectá-la de forma indireta devido à sua propriedade de formar complexos com íons cúpricos. Um sensor foi desenvolvido para a detecção de glifosato, usando a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) e um eletrodo de carbono vítreo (GC) modificado com um compósito de óxido de grafeno reduzido (rGO) e nanopartículas de cobre (CuNPs), sintetizado por método químico. O comportamento eletroquímico dos eletrodos GC/rGO-CuNPs foi caracterizado por voltametria cíclica (CV) em solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 no intervalo de -0,3 a +0,2 V vs. Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹), com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Foram observados processos de oxidação em 30 mV e redução em -180 mV, que comprovam que rGO foi modificado com as CuNPs. Por DPV, a diminuição na corrente de pico anódica do cobre em presença de glifosato, atribuída formação do complexo Cu(II)-glifosato, foi usada para quantificar o analito em amostras. Assim, o eletrodo desenvolvido foi avaliado e otimizado na detecção glifosato por DPV, e os melhores resultados obtidos foram nas seguintes condições: proporção de cobre de 30% em relação ao rGO, 100 mV de amplitude de pulso, incremento de potencial de 6 mV, velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹ e potencial e tempo de pré-concentração de -1V por 45s em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0. Com esses parâmetros, a figura de mérito foi linear nas faixas de concentração de 10 a 110 n^omol L⁻¹, 0,1 a 1,1 μmol L⁻¹ e 1 a 11 μmol L⁻¹ de glifosato. O compósito sintetizado é capaz de detectar glifosato e o sensor desenvolvido mostrou-se promissor para determinação de glifosato em meio aquoso.

Palavras-chave: glifosato; grafeno; nanopartículas de cobre; eletroanalítica.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS E TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
INTRODUÇÃO	14
O Glifosato	14
Toxicidade do Glifosato	18
Análise de glifosato	20
Sensores voltamétricos para glifosato	21
Nanopartículas	23
Grafeno	24
Fundamentos da Voltametria	26
OBJETIVO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
Equipamentos e técnicas	35
Reagentes e Soluções	35
Síntese dos compósitos rGO e rGO-CuNPs	36
Preparo dos eletrodos	37
Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica	37
Otimização do compósito rGO-CuNPs	38
Detecção de glifosato e AMPA por DPV	38
Avaliação do sinal após adição de concentrações elevadas de glifosato	39
Detecção de glifosato por DPV em amostras de urina sintética	39
Estudo de interferentes	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
Caracterização Morfológica	41
Caracterização Eletroquímica	43

Otimização do compósito rGO-CuNPs	46
Detecção de glifosato e AMPA por DPV	49
Avaliação do sinal após adição de concentrações elevadas de glifosato	53
Estudo de interferentes	54
Análise de glifosato em amostra de urina sintética	55
CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural plana do glifosato.....	15
Figura 2: Reação inibida pela ação de glifosato: conversão de chiquimato-3-fosfato a 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato.....	16
Figura 3: Equilíbrios e constantes de dissociação do glifosato.	17
Figura 4: Vias de degradação do glifosato: A) clivagem oxidativa da ligação carbono-nitrogênio, resultando na formação de AMPA; B) clivagem da ligação carbono-fósforo que resulta na formação de sarcosina.	17
Figura 5: Reação de aromatização da testosterona, um hormônio andrógeno (masculino), produzindo estradiol.	19
Figura 6: Fórmula estrutural plana do complexo cobre-glifosato 1:1.....	22
Figura 7: Estados alotrópicos do carbono.....	24
Figura 8: Arranjos moleculares do grafeno..	26
Figura 9: Representação de uma célula eletroquímica.....	27
Figura 10: Funcionamento do sistema de três eletrodos.	27
Figura 11: Representação das camadas de íons em torno do eletrodo de trabalho carregado.....	28
Figura 12: Voltamograma cíclico de um processo redox reversível..	32
Figura 13: Voltamograma cíclico de um processo a) reversível; b) quase reversível; c) irreversível..	33
Figura 14: Caracterização dos eletrodos por CV em PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,4 e velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ , onde: (A) GC, GC/rGO e GC/rGO-CuNPs 30% e (B) GC/rGO-CuNPs 30% com e sem aplicação de potencial de pré-concentração de -1 V por 60 s.	43
Figura 15: Caracterização dos eletrodos a) GC/rGO-CuNPs 30% , b) GC/rGO, c) GC por CV em ácido sulfúrico 0,1 mol L ⁻¹ , ferricianeto de potássio 1,0 mmol L ⁻¹ e velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	44
Figura 16: Perfis voltamétricos por CV em PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,4 dos eletrodos (A) GC, (B) GC/rGO e (C) GC/rGO-CuNPs (30%) em ausência (--) e presença de 50 µmol L ⁻¹ de glifosato (--), com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹	45
Figura 17: DPV de eletrodos GC/rGO-CuNPs com diferentes proporções de Cu em PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,4, com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 1 mV.....	46
Figura 18: DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs (Cu50%) em PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7.4, velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 1 mV, com aplicação de potencial de pré-concentração: (A) variado de -0,5 a -1,1 V por 60 s e (B) de -1,0 V com intervalo variado de 15 a 60 s.	47
Figura 19: DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs (Cu50%) em PBS 0,2 mol L ⁻¹ , com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 1 mV em diferentes pHs.	48

Figura 20: DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs (Cu50%) em PBS 0,2 mol L ⁻¹ com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ com (A) amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial variado de 1 a 10 mV e (B) incremento de potencial de 6 mV e amplitude de pulso variada de 10 a 100 mV.	49
Figura 21: A) DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 6 mV nas concentrações de 0, 10, 30, 50, 70, 90 e 110 η mol L ⁻¹ de glifosato; B) respectivas taxas de inibição.	50
Figura 22: DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 6 mV, com varredura de potencial de +0,2 a -0,3V, nas concentrações de 0, 0,2, 0,5, 0,8, 1, 2 e 4 η mol.L ⁻¹ de glifosato.	51
Figura 23: Taxas e inibição plotadas a partir das DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial nas faixas de concentração de 0,2 η mol.L ⁻¹ a 11 μ mol L ⁻¹	51
Figura 24: DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 6 mV nas concentrações de 0, 10, 30, 50, η mol L ⁻¹ e 10 μ mol L ⁻¹ de glifosato.	53
Figura 25: Estruturas moleculares do glifosato e dos interferentes utilizados. Fonte: próprio autor. ...	55
Figura 26: DPVs dos eletrodos GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial variado de 6 mV, onde a é a amostra em branco, à qual foram então adicionados: b) urina sintética + 20 η mol L ⁻¹ de glifosato; c,d e e - 30, 50 e 70 η mol L ⁻¹ de glifosato, respectivamente.	55
Figura 27: Taxas e inibição plotadas a partir das DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial na faixa de concentração de 30 a 70 η mol L ⁻¹	56

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Características químicas do glifosato e seu subproduto AMPA.	18
Quadro 2: Tipos de voltametria de acordo com a aplicação de potencial	30
Quadro 3: Quantidade utilizada de cobre nos compósitos rGO-CuNPs.	36
Quadro 4: Sais usados no preparo da amostra de urina sintética.	40
Quadro 5: Imagens FEG-SEM da superfície dos filmes rGO e rGO-CuNPs 30%.	42
Tabela 1: Correntes e potenciais de pico anódicos e catódicos para os eletrodos estudados em solução em solução de H ₂ SO ₄ contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆].	44
Tabela 2: Efeito de alguns agrotóxicos na inibição de 1,0 μ mol L ⁻¹ glifosato em condições otimizadas por DPV, quando comparado com a solução que não contem o interferente.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA – Ácido aminometilfosfônico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE – Contraeletrodo

CEATOX– Centro de Assistência Toxicológica

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

CuNPs – Nanopartículas de cobre

CV – Voltametria cíclica

ddp – Diferença de potencial

DL50 – Dose letal média

DPV – Voltametria de pulso diferencial

EFSA – European Food Safety Authority

EPA – Environmental Protection Agency

Epa – Potencial de pico anódico

Epc – Potencial de pico catódico

Er – Eletrodo de referência

Et– Eletrodo de trabalho

E⁰– Potencial redox

FEG-SEM– Microscopia Eletrônica de Varredura Acoplada a Canhão de Emissão de Campo

GC – Carbono vítreo

GO – Óxido de grafeno

IARC– International Agency for Research on Cancer

Ipa – Corrente de pico anódica

Ipc – Corrente de pico catódica

NPs– Nanopartículas

NTs – Nanotubos de carbono

PBS – Solução fosfato

ppm – Partes por milhão

rGO – Óxido de grafeno reduzido

UV– Ultravioleta

INTRODUÇÃO

O agronegócio está entre as mais importantes atividades econômicas do Brasil, estando ele entre os maiores exportadores agrícolas do mundo. A soja é o maior produto de exportação do Brasil, tendo sido exportadas 68 milhões de toneladas em 2016, com faturamento corresponde a 23% do valor bruto de produção do país (1). Nesse contexto de aumento de produtividade agrícola associada a monoculturas, surge a discussão sobre o uso de agrotóxicos e os riscos que eles podem trazer à saúde e ao ambiente.

O uso de agrotóxicos foi historicamente a alternativa mais acessível para assegurar a produtividade agrícola brasileira, o que conferiu ao país a entrada de forma competitiva no mercado internacional (2). Por ser um dos maiores produtores agrícolas, Brasil está entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (3), e a exposição a estes compostos pode ocasionar efeitos adversos– traços de resíduos presentes no solo, água, ar e alimentos geram um alerta à saúde e ao meio ambiente (4). O uso crescente de agrotóxicos na agricultura gera cada vez mais resíduos nos alimentos, o que tem motivado preocupação com a saúde pública e necessidade de controlar e monitorar o uso destes compostos (5). Além disso, a exposição ocupacional agrava a preocupação com o tema, ainda mais porque são muito usados, mas ainda pouco estudados do ponto de vista toxicológico.

O glifosato é o pesticida mais vendido no mundo e estima-se que tenham sido usados 6,1 bilhões de quilogramas de glifosato entre 2004 e 2014. No Brasil, o glifosato é o agrotóxico mais usado, principalmente no cultivo de soja, milho e algodão, e representa 40% do total de pesticidas usados (3,6).

O Glifosato

A presença de plantas daninhas em áreas cultivadas compromete a produção agrícola devido à competição por recursos do solo, principalmente a luz solar, dessas espécies com as plantas de interesse econômico (7). Para controlar o crescimento de ervas daninhas e melhorar a produtividade agrícola são utilizados compostos orgânicos sintéticos denominados herbicidas (8).

Um importante herbicida usado mundialmente é o glifosato, N-(fosfonometil)glicina (Figura 1), que apresenta ação de amplo espectro, é não-seletivo, sistêmico, pós-emergente e é amplamente utilizado no controle de plantas daninhas(9). É usado para controle de plantas mono e dicotiledôneas anuais e perenes (10). Foi sintetizado, patenteado e começou a ser comercializado para uso como herbicida na década de 70 pela Monsanto Co (11).

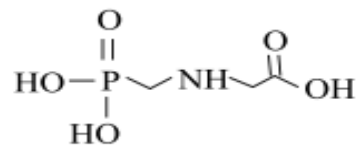


Figura 1: Fórmula estrutural plana do glifosato.

A ação do glifosato ocorre pela inibição de uma enzima presente em bactérias, fungos e plantas, envolvida na síntese de corismato, um precursor dos aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina. Ocorre uma inibição competitiva com a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), que age na conversão de chiquimato-3-fosfato em 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato (Figura 2) (12).

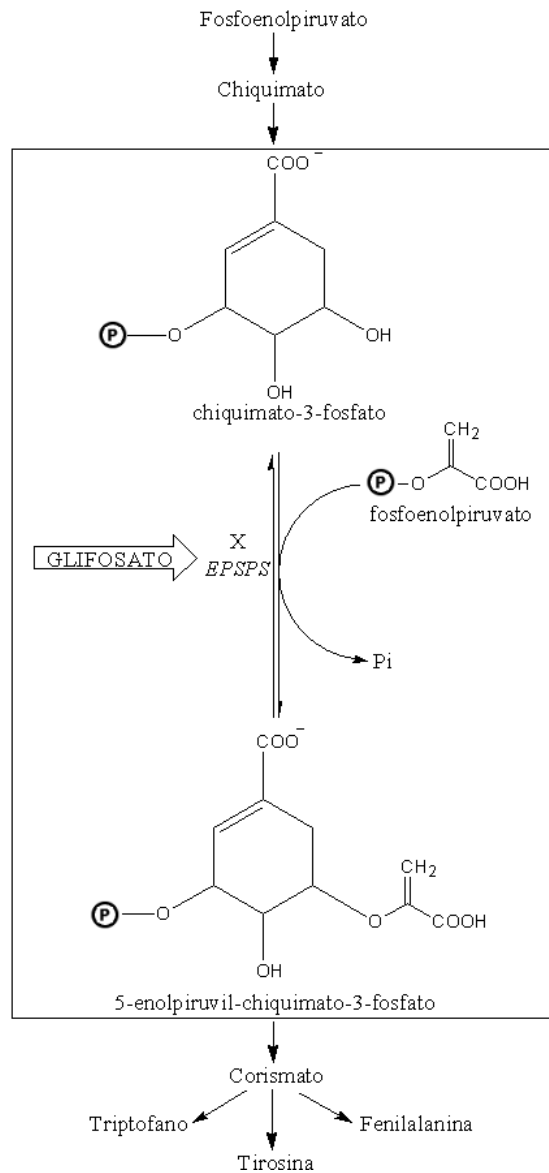


Figura 2: Reação inibida pela ação de glifosato: conversão de chiquimato-3-fosfato a 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato. Adaptado da ref.(12).

O glifosato é solúvel em água e apresenta baixa afinidade por lipídeos. Pode atuar tanto como ácido fraco quanto como base fraca (*zwitterion*), e assume diferentes cargas de acordo com o pH (10), sendo a carga líquida positiva em pH abaixo de 2 e aumento de cargas negativas com aumento de pH (13), apresentando-se como um ânion em pH próximo da neutralidade (11) (Figura 3).

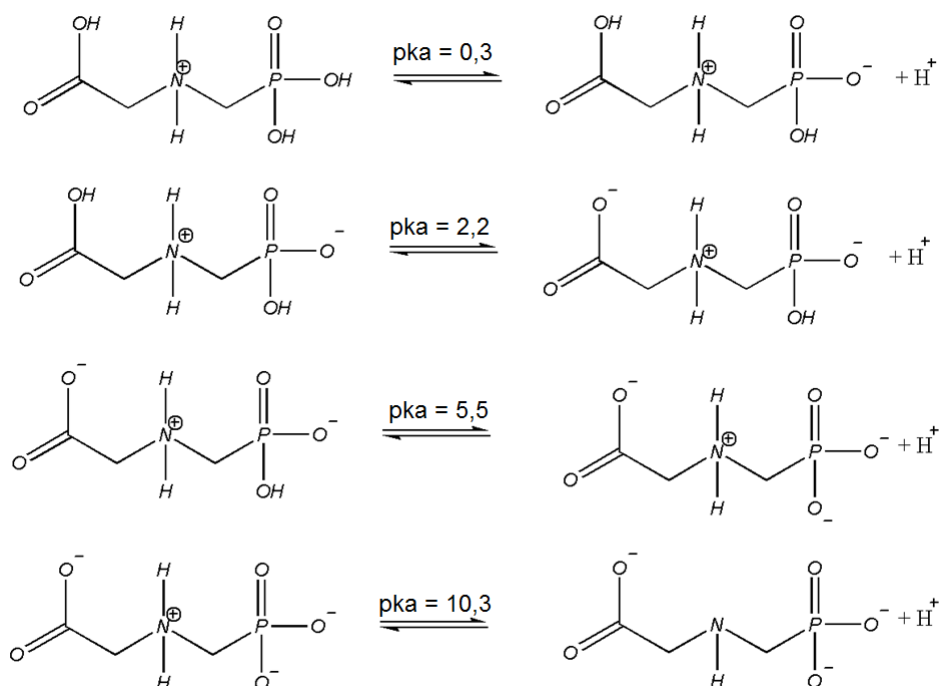


Figura 3: Equilíbrios e constantes de dissociação do glifosato. Adaptado das ref. (10) e (13).

A degradação no solo é bacteriana, podendo acontecer por duas vias: por ação da glifosato oxidoredutase, formando ácido aminometilfosfônico (AMPA), que é o principal subproduto; ou através da atuação de uma enzima C-P liase que remove o grupo fosfato, formando sarcosina, entrando então no metabolismo dos aminoácidos (Figura 4) (14).

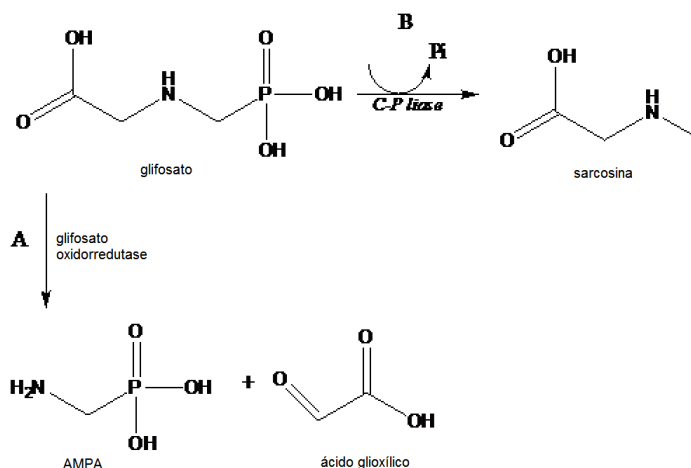
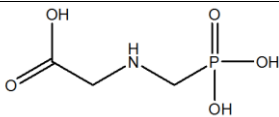
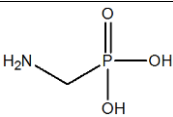


Figura 4: Vias de degradação do glifosato: A) clivagem oxidativa da ligação carbono-nitrogênio, resultando na formação de AMPA; B) clivagem da ligação carbono-fósforo que resulta na formação de sarcosina. Adaptado das ref.(9,14,15).

A molécula livre de glifosato se degrada em poucos dias no solo, mas se torna mais persistente quando adsorvida no solo, tendo sido relatado o período de

meia-vida de até 835 dias nesta última condição (16). O AMPA, principal produto de sua degradação, apresenta persistência maior que o glifosato no solo, sendo relatadas meias-vidas de 76 a 958 dias em diferentes tipos de solo, além de ser mais volátil (Quadro 1) (17,18).

Quadro 1: Características químicas do glifosato e seu subproduto AMPA.

	Glifosato	AMPA
Estrutura molecular		
Coefficiente de partição octanol/água (log k_{ow})	-4,1	
Solubilidade em água	10.000– 15.700 mg L ⁻¹ a 25°C	
Temperatura de ebulição	200 - 230 °C	120°C
Meia-vida (no solo)	6 a 9 dias	76 a 958 dias
DL₅₀ oral	2000 mg kg ⁻¹	8.300 mg kg ⁻¹

Fontes: ref. (10,16–19).

Toxicidade do Glifosato

O glifosato é um dos agentes tóxicos mais prevalentes em acidentes de intoxicação humana (3). É irritante dérmico e ocular, e pode danificar fígado e rim se for ingerido em doses elevadas, e sua excreção ocorre principalmente pela urina – sendo a dose diária aceitável de 0,05 mg kg⁻¹d⁻¹ (9). Ele não afeta o sistema nervoso por inibição da enzima colinesterase, como ocorre com os pesticidas carbamatos e organofosforados, e apresenta boa eficiência e baixa toxicidade (DL₅₀oral alta, mostrado no Quadro 1), mas há evidências de impactos ao meio ambiente: resíduos de glifosato são encontrados no solo, em colheitas, gado de corte, leite e água (20). Do ponto de vista da segurança alimentar, no Brasil estima-se que a ingestão diária de glifosato esteja dentro dos limites aceitáveis (21).

Embora o glifosato na sua forma pura seja pouco tóxico, a composição mais comercializada apresenta toxicidade aguda maior por conter em sua formulação o surfactante polietoxietileno amina (POEA), o qual apresenta traços de 1-4dioxano, que é cancerígeno e pode causar danos aos rins e fígado – o que fez com que o surfactante já venha sendo substituído em algumas formulações. Estudos apontam

que sua combinação com moléculas ambientais pode originar compostos cancerígenos para os quais não há nível seguro de exposição (3). As formulações comerciais de glifosato apresentam surfactantes para melhorar a lipofilicidade e facilitar assim a absorção do herbicida pelas folhas (22).

Além do uso em lavouras, o glifosato também é utilizado no controle de plantas aquáticas. Peixes e animais invertebrados são mais sensíveis a esse herbicida, bem como plantas que não são alvos do tratamento com glifosato podem ser prejudicadas, ainda mais quando há uso em doses acima da dose indicada pelo fabricante (9). Também há indícios de que ele seja tóxico para anfíbios (23) e que possa ocasionar distúrbios de comportamento em abelhas (24).

Estudos mostram que o glifosato pode atuar como disruptor endócrino, inibindo a produção da enzima aromatase, a qual é mediadora da aromatização(25) de hormônios andrógenos a estrógenos (26) (Figura 5). Thongprakaisang *et al* relacionam o desequilíbrio hormonal gerado pelo glifosato ao câncer de mama em mulheres (27). Além disso, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou o glifosato como possivelmente carcinogênico para seres humanos devido a estudos recentes que relacionam a exposição a este herbicida à alta incidência de linfoma em humanos (28–30).

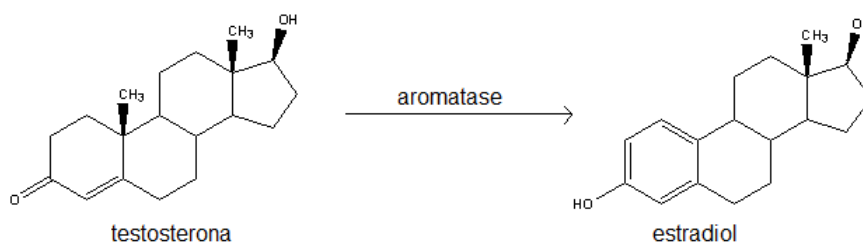


Figura 5: Reação de aromatização da testosterona, um hormônio andrógeno (masculino), produzindo estradiol, um hormônio estrógeno (feminino). Esta conversão é mediada pela enzima aromatase, pertencente às enzimas do citocromo p450, que agem na síntese de hormônios esteroides, e encontram-se nas células do fígado e do intestino delgado. Adaptado da ref. (31).

Sobre o potencial carcinogênico do glifosato, ainda não há consenso entre as principais agências de saúde internacionais. De um lado, A EFSA (European Food Safety Authority) e a EPA (Environmental Protection Agency) concluíram que não há provas suficientes que relacionem o glifosato a casos de câncer, e, de outro, a IARC classificou o glifosato como categoria 2A, possivelmente carcinogênico (32–34). Essa divergência de opiniões pode ser explicada pelo uso de diferentes conjuntos de dados e metodologias de avaliação toxicológica pelas agências (35).

Após debates acerca dos efeitos tóxicos do glifosato, a França declarou a possibilidade de banir o uso de glifosato no país até 2022, e o Parlamento Europeu cogitou a possibilidade de restringir e banir o uso de glifosato em outubro de 2017. No entanto, sob o argumento de que não há outro composto similar que seja tão eficaz e menos tóxico que ele, a licença foi renovada por mais cinco anos. (36)

Outros estudos também relacionam a exposição ao glifosato à alteração da função mitocondrial (37), alteração na atividade de neurotransmissores em cérebros de ratos (38) e até neurodegeneração (39), e diminuição na movimentação de dáfnias em água – que poderia interferir na cadeia alimentar aquática (40). Além disso, autores também relacionam a ação do glifosato nas bactérias do trato intestinal a desordens gastrointestinais, intolerância ao glúten, doença celíaca, diabetes e depressão, entre outros (41–43).

O uso de plantas geneticamente modificadas resistentes ao glifosato, especialmente soja, milho e algodão, traz uma preocupação adicional: o uso em excesso do herbicida. Além disso, o Brasil não possui leis específicas que restrinjam o uso de glifosato nem a quantidades de resíduos deste pesticida no solo (44).

Análise de glifosato

O monitoramento de agrotóxicos no ambiente e em amostras biológicas é imprescindível para que os efeitos tóxicos sejam estudados, minimizados e controlados. Análises de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais e biológicas requerem técnicas capazes de detectar e quantificar baixas concentrações dos analitos com boa seletividade, sensibilidade, exatidão e precisão. O grande desafio é a obtenção de percentuais satisfatórios de recuperação dos analitos, bem como a minimização das interferências através do uso de métodos de extração eficientes.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia a gás (CG) são as técnicas mais utilizadas para detectar e quantificar glifosato (20). No entanto, a molécula do glifosato apresenta características que dificultam sua extração, como elevada polaridade e insolubilidade em solventes orgânicos, que dificulta a extração por solvente. Há, por isso, a necessidade de usar procedimentos de derivatização durante a extração, em etapas que antecedem a separação cromatográfica ou ainda

em reação de troca iônica em coluna (45). Tantas etapas de preparo de amostra podem diminuir a recuperação do composto e aumentar o tempo de análise e também o custo, devido ao uso de grande quantidade de reagentes. Um método de análise de glifosato não derivatizado em amostras de arroz e soja foi proposto, mas com a necessidade de uma coluna de cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), a qual ainda apresenta vida útil pequena (46). Além disso, poucos são os trabalhos que tragam procedimentos para análises em amostras biológicas, sendo a maioria validada para amostras de água e solo.

Outra dificuldade na detecção de glifosato ocorre devido à ausência de grupos cromóforos na molécula, que impossibilita detecção direta por detectores colorimétricos, UV ou fluorimétricos (20). Sob a justificativa de se tratar de um analito com metodologia específica de análise, que sobrecarregaria a rotina dos seus laboratórios, até 2017 a ANVISA não contemplou o glifosato em seu relatório anual de resíduos de agrotóxicos em alimentos (47), mas alega que ele será incluído no próximo relatório (48).

Além dos métodos cromatográficos, outras técnicas de análise vêm sendo desenvolvidas, entre elas: espectrofotometria (49,50), polarografia e eletroforese (18), coulometria (51) e sensores de fluorescência e eletroquimioluminescência (52–54). Devido à importância deste herbicida, o desenvolvimento de métodos de extração e análise que permitam sua detecção e quantificação em amostras naturais é de suma importância. A maior parte das metodologias desenvolvidas para análise de glifosato envolve técnicas cromatográficas e por isso é importante estudar métodos alternativos que supram as limitações que as técnicas utilizadas atualmente apresentam.

Sensores voltamétricos para glifosato

A voltametria é uma técnica versátil que surge como alternativa na análise de compostos orgânicos, pois apresenta vantagens quando comparada à cromatografia. Os métodos eletroanalíticos apresentam simplicidade de manuseio, baixo custo, resposta rápida, alta sensibilidade, potencial para ser miniaturizado e automatizado, sendo de interesse para análises *in situ* e em campo (55).

Para ser estudado por voltametria, há necessidade de que o analito sofra reação redox na janela de potencial estudada (seja eletroativa). A molécula do

glifosato não é eletroativa, logo, não pode ser detectada voltametricamente (56). No entanto, a capacidade de formar compostos de coordenação com íons cúpricos torna a detecção indireta do glifosato possível por voltametria.

Em presença de íons metálicos, o glifosato pode se coordenar como um ligante tridentado por apresentar três grupos com habilidade de se ligar com metais: fosfonato $[R-PO(OH)_2]$, amino e carboxilato. Em pH perto do neutro, os grupos carboxilato e fosfonato estão desprotonados, o que facilita a coordenação com metais de transição. Ele pode formar complexo com cobre, zinco, manganês, níquel, e outros, sendo mais estudado o de cobre. A configuração eletrônica do cobre é $[Ar]3d^{10}4s^1$, podendo apresentar três estados de oxidação: +1, +2 e +3. O estado +1 apresenta forte tendência a passar para o estado +2 (reação de desproporcionamento), o estado +2 é o mais comum e +3 é o mais raro (57).

Dois tipos de complexo glifosato-cobre são possíveis, sendo que em ambos é o nitrogênio quem se liga ao cobre: no complexo 1:2, duas moléculas de glifosato se ligam a um íon cobre; na estrutura 1:1 (Figura 6), uma molécula de glifosato se liga a um íon cobre e forma-se uma estrutura de dois anéis quelatos (13).

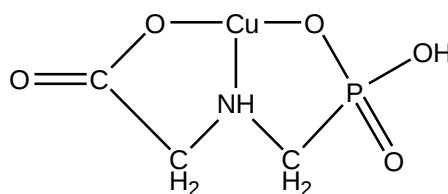


Figura 6: Fórmula estrutural plana do complexo cobre-glifosato 1:1. Adaptado da ref. (13).

Alguns eletrodos baseados em cobre para detecção de glifosato são relatados na literatura. Dispositivos eletroquímicos utilizando o eletrodo de cobre metálico foram desenvolvidos e atingiram limites de detecção de $0,35 \mu\text{mol L}^{-1}$ (58) e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (59) usando a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV). Outro trabalho relata a aplicação de sensores eletroquímicos para detecção de glifosato em água potável desenvolvidos utilizando eletrodos de pasta de carbono e carbono vítreo e cobre eletrodepositado. Recuperações das amostras enriquecidas com glifosato entre 96 e 104% foram alcançadas utilizando a técnica de voltametria cíclica (CV) (60). Um eletrodo de carbono vítreo foi modificado com filme de ftalocianina de cobre e nanotubos de carbono, tendo obtido um limite de detecção de 12 nmol L^{-1} para o glifosato por DPV (61).

Não foram encontrados trabalhos que utilizem grafeno e nanopartículas de cobre para detecção de glifosato por voltametria. Chang *et al* produziram um material composto por nanopartículas de óxido de cobre sobre nanotubos de carbono para detecção indireta por fluorescência (52). Um sensor com foi produzido a partir de um filme polimérico nanoestruturado sobre uma base de grafite que detecta glifosato derivatizado com grupo n-nitroso (62).

Outro método foi proposto para análise de um derivado do glifosato por polarografia com pulso diferencial. A amina secundária presente na molécula de glifosato pode sofrer uma N-nitrosação em presença de nitrito em meio ácido, formando-se nitrosamina, que, por sua vez, sofre uma redução irreversível em solução ácida que pode ser determinada voltametricamente. O AMPA não sofre nitrosação, então esse método apenas serve para detecção de glifosato (63).

Nanopartículas

As propriedades ópticas, eletrônicas e mecânicas dos materiais são fortemente dependentes do tamanho das partículas do material, fato este que trouxe destaque aos nanomateriais no final do século XX no ramo da ciência dos materiais. O material passa a apresentar propriedades físicas e químicas diferentes quando em escalas menores que o chamado tamanho crítico, o qual depende do material e também da propriedade em questão. Além disso, abaixo deste tamanho, a composição e o formato (esférico, tubular, em folha *etc.*) das partículas também conferem propriedades específicas ao material. É dito que as nanopartículas sólidas apresentam características intermediárias entre a molécula isolada e a composição em escala maior (*bulk*) (64).

Quando comparadas ao *bulk*, as nanopartículas apresentam maior razão superfície/volume e também uma maior exposição de carga dos átomos da parte interna da partícula, alterando-se com isso os níveis de energia, estrutura eletrônica e reatividade dos átomos ao longo da estrutura.

Esse fenômeno ocorre em grande parte das vezes em escalas entre 1 e 100 nm, mas na verdade o que importa é a molécula em questão estar abaixo do tamanho crítico – embora seja comum dizer que todo nanomaterial deve ter, ao menos, uma dimensão na faixa nanométrica. Uma folha de grafeno, por exemplo, é

composta por um arranjo bidimensional de hexágonos de carbono sp^2 , que empilhadas formam o grafite (64).

A síntese de nanopartículas pode ser feita por métodos físicos (*top-down*), em que se parte de partículas maiores, sendo exemplo disso a nanolitografia, ou também por métodos químicos (*bottom-up*), que utilizam de reações químicas para sua obtenção. As nanopartículas são termodinamicamente instáveis e tendem a se agregar e crescer, formando aglomerados – para diminuir tal efeito, é comumente utilizado nas rotas sintéticas o controle de temperatura e uso de moléculas estabilizantes ou eletricamente carregadas. A imobilização das nanopartículas no substrato também pode ser feita de várias maneiras, sendo uma delas a solubilização em um solvente que posteriormente possa ser evaporado, para que então se forme um filme contendo o composto nanoparticulado sobre o substrato de interesse (65). Nanopartículas de antimônio foram obtidas e imobilizadas com sucesso em óxido de grafeno reduzido através do uso de dodecilsulfato de sódio como surfactante, borohidreto de sódio como agente redutor e etapas de agitação, ultrassom e centrifugação por Cesarino *et al* (55).

Grafeno

O carbono é um elemento versátil, que apresenta naturalmente três estados alotrópicos: amorfo, grafite, diamante (Figura 7). O carbono grafite é composto por camadas de grafeno, que é a unidade estrutural básica de outros alótropos nanoestruturados do carbono, como o fulereno (que é uma “esfera de grafeno”) e o nanotubo (folha de grafeno enrolada em formato de cilindro) (66).

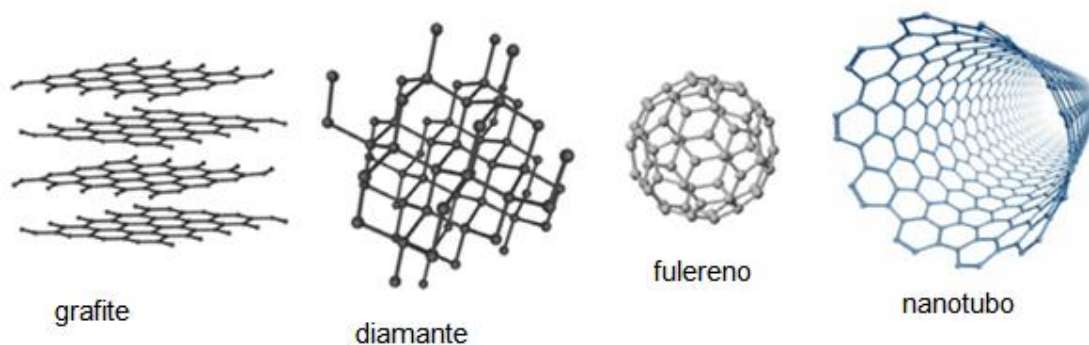


Figura 7: Estados alotrópicos do carbono. Fonte: ref. (67).

O grafeno foi isolado pela primeira vez em 2004, tendo rendido o prêmio Nobel de Física em 2010, embora já fosse conhecido há décadas. Apresenta propriedades notáveis que despertam cada vez mais o interesse científico: é o mais fino material conhecido (espessura de cerca de 1 Angstrom ou 10^{-8} cm – tamanho de um átomo de carbono), é muito resistente, flexível e apresenta elevada área superficial e boa condutividade térmica. Ele é um excelente condutor elétrico, melhor até que o cobre, motivo pelo qual tem sido muito usado em sensores eletroquímicos, sendo ainda encontradas algumas melhorias de desempenho quando usado como suporte para outras nanopartículas, como metais, óxidos metálicos, semicondutores e *quantum dots* (66–68).

Tanto o grafeno quanto os nanotubos (NTs) são excelentes materiais para se construir sensores e biossensores, pois têm propriedades superiores ao grafite e carbono vítreo: apresentam distribuição homogênea de sítios eletroquimicamente ativos em escala nanométrica e elevada área superficial. No entanto, quando comparados, o grafeno é um material mais homogêneo porque os NTs apresentam impurezas metálicas devido ao processo de obtenção. No que diz respeito à área superficial, o grafeno também é superior, com $2630 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ de área, que é muito maior que a dos nanotubos ($1315 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) e do grafite ($\sim 10 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$). Além disso, as folhas de grafeno podem ser funcionalizadas covalente ou não-covalentemente com grupos oxigenados, o que pode agregar características interessantes ao material - isso influencia a taxa de transferência de elétrons e também a adsorção de moléculas (69).

A produção de grafeno a partir do grafite pode ser feita fisicamente, por esfoliação, ou quimicamente, onde se obtém óxido de grafeno (GO). O GO é um precursor para a produção de óxido de grafeno reduzido (rGO), sendo que a produção de grafeno por redução química do GO está entre as formas mais eficientes de obtenção de grafeno. Existem na literatura muitas variações das rotas químicas para síntese de GO a partir do grafite (70). No entanto, o rGO obtido desta forma ainda pode apresentar grupamentos oxigenados e defeitos estruturais que comprometem a qualidade do material, e por isso novas rotas químicas de obtenção por síntese total de grafeno a partir de outras moléculas orgânicas vem sendo estudadas (67). Também é possível obter grafeno através da abertura do nanotubos de carbono (66). A Figura 8 ilustra a diferença entre o grafeno, o óxido de grafeno e o óxido de grafeno reduzido.

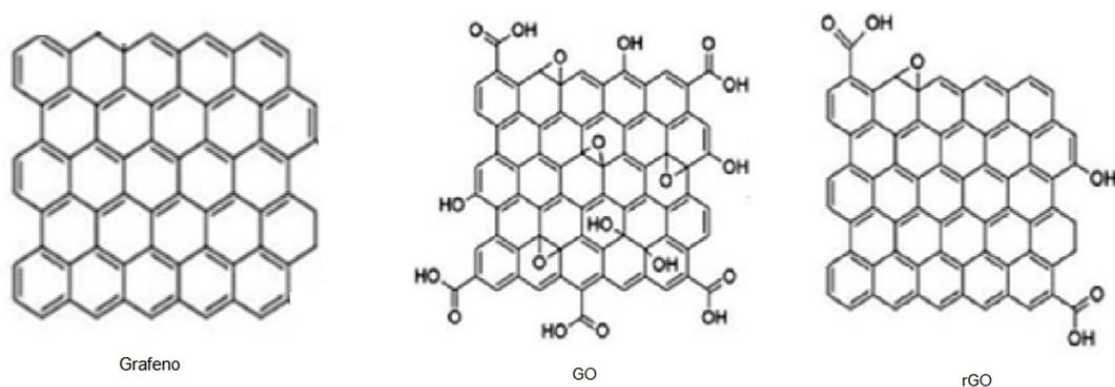


Figura 8: Arranjos moleculares do grafeno. Fonte: ref. (71).

Fundamentos da Voltametria

A Célula Eletroquímica

Os métodos eletroanalíticos utilizam as propriedades elétricas de uma solução para obter informações de um analito (espécie eletroativa) nela contido, sendo para isso necessário aplicar uma perturbação controlada no sistema eletroquímico. A voltametria é um método eletroanalítico que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução próxima a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial.

O aparato utilizado nas medidas consiste em uma célula eletroquímica: uma solução de eletrólitos com eletrodos submersos, ligados entre si, de forma a estabelecer um circuito elétrico de corrente contínua. Esses elementos devem ser bons condutores, para que ocorra um movimento iônico e uma reação de transferência de elétrons. Este sistema é conectado ao potenciostato, que é o dispositivo eletrônico usado para aplicar a ddp (Figura 9).

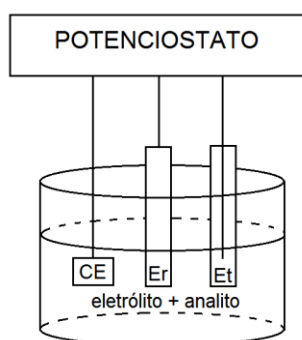


Figura 9: Representação de uma célula eletroquímica.

A ddp é aplicada entre os eletrodos de trabalho (Et) e referência (Er), mas somente o Et deve sofrer polarização. Para garantir a estabilidade do Er, utiliza-se um eletrodo adicional, o contraeletrodo (CE). O potenciostato é munido de um amplificador operacional que aumenta a resistência no Er e diminui no CE, de modo que a corrente flua entre o Et e o CE (Figura 10) (72).

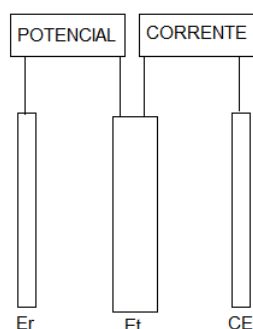


Figura 10: Funcionamento do sistema de três eletrodos: o potencial é aplicado entre os eletrodos de trabalho e referência; a corrente flui entre o eletrodo de trabalho e o contraeletrodo.

Além do analito, a solução deve conter um eletrólito de suporte (sal, ácido, tampão *etc.*), que é responsável por garantir a força iônica, condutividade e pH, além de evitar o transporte de massa por migração (por movimento de íons, que será discutido a seguir). Este eletrólito é usado em concentração muito maior que da espécie eletroativa (cerca de cem vezes), o que torna as interações iônicas praticamente constantes, independente da concentração do analito. Por isso, o eletrólito de suporte permite estimar o valor do potencial do eletrodo como uma função da concentração (73).

As medidas de corrente são feitas a partir do que acontece na região de interface Et/solução, que é diferente do restante da solução (74). Quando o Et está carregado, as moléculas de solvente ao seu redor se orientam de modo a neutralizar

o sistema, e formam-se duas regiões diferentes ao longo na solução: uma que sofre influência do eletrodo (próxima ao eletrodo), e outra que não (seio da solução, mais afastada). Perto do Et forma-se a chamada dupla camada elétrica (Figura 11), composta por:

- uma camada interna de moléculas com densidade de carga orientada no sentido de neutralizar a carga do Et, e que por isso perdem mobilidade por estarem adsorvidas ao Et;

- uma camada externa (camada difusa), de moléculas do analito solvatadas e que têm certa mobilidade e sofrem atração do Et por interações de longa distância. A concentração do analito na camada difusa é proporcional à concentração de analito no seio da solução (72).

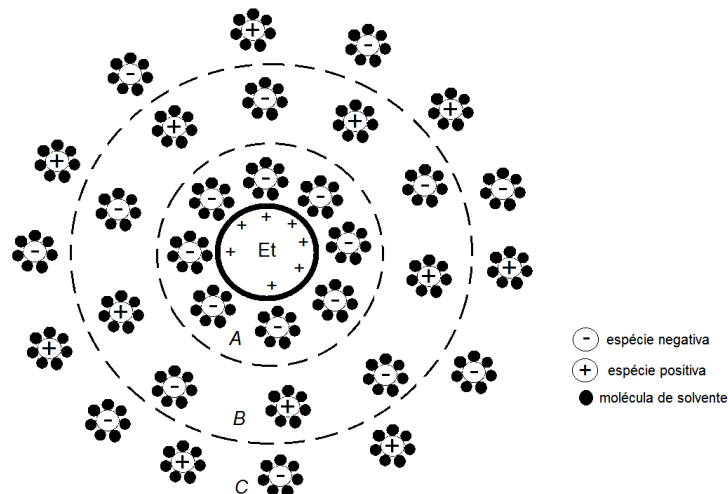


Figura 11: Representação das camadas de íons em torno do eletrodo de trabalho carregado, onde: A) é a camada interna, B) camada difusa, C) seio da solução.

A natureza da corrente gerada nesse sistema é de dois tipos:

- **Corrente faradaica:** segue a lei de Faraday – que estabelece que a extensão de uma reação química que ocorre no eletrodo é proporcional à corrente. Quando o potencial aplicado no Et atinge um valor tal que permite a ocorrência da reação redox com o analito, inicia-se a transferência de elétrons. Isso gera corrente proporcionalmente à concentração de analito presente no seio da solução (74).
- **Corrente não-faradaica/capacitiva:** não segue a lei de Faraday, e surge devido ao acúmulo de carga na dupla camada. É necessário diminuir ao máximo a contribuição desta corrente na análise da

corrente total, sendo por isso utilizados eletrodos de pequena área e modos de aquisição de sinal de corrente que diminuam sua contribuição (que serão discutidos à frente) (72).

A corrente faradaica se mantém constante devido à transferência de massa da espécie eletroativa do seio da solução para a interface Et/solução, podendo isso ocorrer por migração, convecção e difusão, sendo somente o último desejável. A difusão é o movimento espontâneo da espécie química devido à formação de um gradiente de concentração do analito: à medida que a espécie eletroativa é oxidada ou reduzida, sua concentração decresce na interface Et/solução, e espontaneamente surge um fluxo desta espécie do seio da solução para perto do eletrodo. O uso do eletrólito de suporte minimiza a migração; manter a solução livre de perturbações cinéticas (em repouso e temperatura constante) minimiza a convecção(74).

Os Voltamogramas

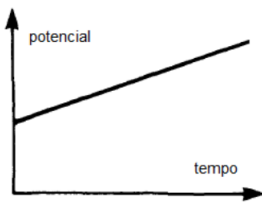
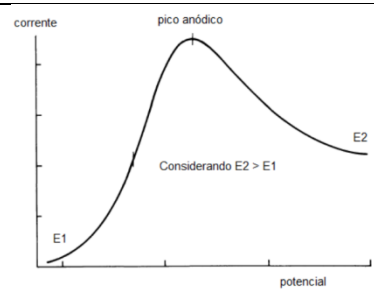
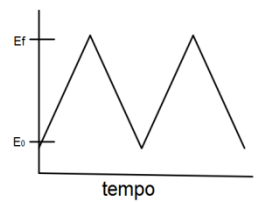
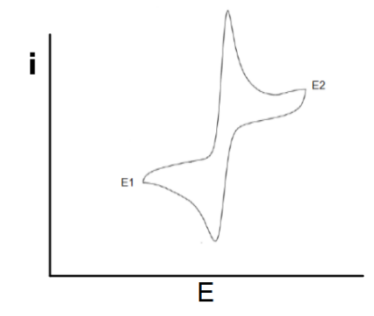
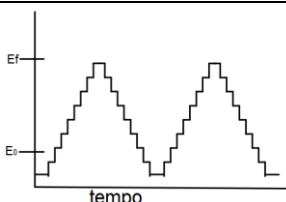
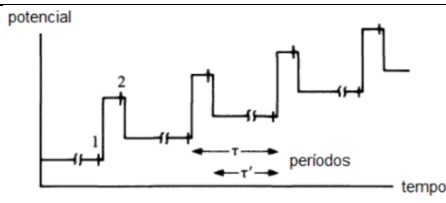
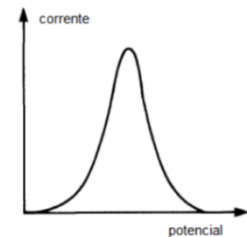
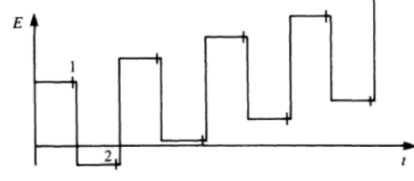
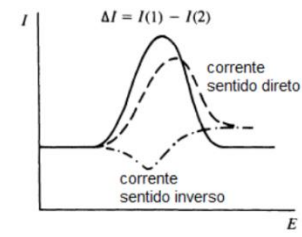
O potencial aplicado sobre o Et possibilita a reação redox na superfície do eletrodo, e isso é feito usualmente em modo de varredura: potenciais mais negativos fazem com que o eletrodo se torne uma fonte de elétrons e favoreça a redução das espécies ao seu redor (varredura catódica); em potenciais mais positivos, a oxidação será favorecida (varredura anódica).

Existem várias técnicas de aquisição de sinais, que se diferem pelo modo como o potencial é aplicado na célula eletroquímica, e o que muda de uma para outra é a sensibilidade e qualidade da informação adquirida (Quadro 2). A voltametria de varredura linear é a menos sensível (alta corrente capacitiva), e consiste na aplicação de um potencial linearmente variado ao longo do tempo. Já as técnicas de pulso são feitas com aplicação de degraus de potencial (fixos ou variáveis), sendo que ambas diminuem muito a contribuição da corrente capacitiva e são muito sensíveis:

- Voltametria de pulso diferencial (DPV): pulsos de amplitude fixa sobrepostos a uma rampa de potencial crescente, com voltamograma resultante formado por picos de corrente de forma gaussiana, cuja área é diretamente proporcional à concentração do analito. É a técnica que permite alcançar os menores limites de detecção;

- Voltametria de onda quadrada: uma onda quadrada simétrica sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada é aplicada. Possui velocidade de análise maior que a DPV (72).

Quadro 2: Tipos de voltametria de acordo com a aplicação de potencial

Nome da técnica	Forma de aplicação de potencial	Resposta de corrente característica
Voltametria linear		
Voltametria cíclica (varredura linear)		
Voltametria cíclica (varredura em escada)		
Voltametria de pulso diferencial		
Voltametria de onda quadrada		

Fonte: ref. (72).

Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica fornece informações qualitativas de processos eletroquímicos (que serão discutidos à frente), e consiste na aplicação de uma varredura tanto no sentido catódico quanto no anódico, partindo-se de um potencial onde não há nenhuma reação redox, formando-se dois picos característicos à oxidação (pico anódico) e redução (pico catódico). Essa técnica é frequentemente usada para analisar o grau de reversibilidade de reações redox. Em um sistema reversível ideal, se estabelece um equilíbrio dinâmico na superfície do eletrodo, onde a quantidade de espécie eletroativa na superfície do Et é constante e a corrente é apenas influenciada pela difusão. A intensidade da corrente medida está relacionada à transferência de elétrons da reação redox e ao transporte de massa da espécie eletroativa (difusão) (75).

Quando se inicia a voltametria cíclica pela varredura no sentido positivo, esse acréscimo de potencial faz com que aumente a velocidade de transferência de elétrons, e com isso a corrente cresce exponencialmente. A corrente aumenta até o ponto em que a concentração da espécie eletroativa começa a diminuir (ela participa da reação e o transporte de massa não é capaz de repor tão rápido), o que faz com que a camada difusa fique mais espessa. Desta forma, a difusão é dificultada e a velocidade de transporte de massa diminui (se torna mais lento o analito migrar do seio da solução para perto do eletrodo). A velocidade da difusão diminui até atingir um valor máximo, onde passa a limitar a reação e então a resposta de corrente decai. A inversão da varredura de potencial causa os mesmos processos no sentido oposto do gráfico (75).

Em sistemas reais, a corrente capacitiva pode gerar um pequeno sinal no início da varredura (a linha se afasta um pouco do eixo horizontal entre o início da varredura e o ponto a), mas mesmo assim a corrente predominante (o pico propriamente dito) é de corrente faradaica. Os parâmetros usados são as posições dos picos formados no voltamograma cíclico, em que I_{pa} e I_{pc} são as correntes de pico anódico e catódico e E_{pa} e E_{pc} são os potenciais de pico anódico e catódico (Figura 12).

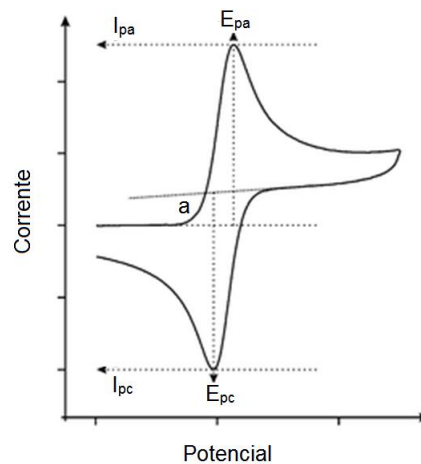


Figura 12: Voltamograma cíclico de um processo redox reversível. Adaptado da ref.(76).

Os sistemas reversíveis apresentam características em comum, que podem ser usadas para identificar se um sistema é reversível:

- 1) Potencial redox (E^0) centralizado entre E_{pc} e E_{pa} :

$$E^0 = (E_{pc} + E_{pa})/2$$

- 2) Em processos monoeletrônicos (com número de elétrons transferidos na reação, n , igual a um), distância entre os picos E_{pc} e E_{pa} é de aproximadamente 0,059 V.

$$E = E_{pa} - E_{pc} = 0,059/n$$

- 3) A corrente de pico pode ser calculada pela equação de Randles-Sevcik, em que A é a área do eletrodo (cm^2); D é o coeficiente de difusão da espécie (cm^2s^{-1}); C é a concentração (mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}).

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \text{ a } 25^\circ\text{C}$$

É possível calcular a corrente de forma indireta, sem precisar conhecer os valores de A , C e D , pela comparação com a corrente de pico de outro composto já conhecido. É bastante comum usar neste caso o par redox ferricianeto de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ / ferrocianeto de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

$$\frac{(I_p/C)_{\text{composto}}}{(I_p/C)_{\text{padrão}}} = \frac{(n)^{3/2}_{\text{composto}}}{(n)^{3/2}_{\text{padrão}}}$$

4) A razão entre as correntes de pico é igual a 1:

$$I_{pc}/I_{pa} = 1$$

Se os critérios de reversibilidade não são atendidos significa que a transferência de carga da reação redox é mais lenta, o que faz com que o pico aumente de maneira menos acentuada (não exponencial). Em outras palavras, a velocidade da transferência de carga diminui quando o processo se afasta da reversibilidade. Quando ocorre uma separação entre E_{pa} e E_{pc} com aumento da velocidade de varredura, tem-se um processo quase reversível: quanto maior a distância entre picos, mais o comportamento se afasta da reversibilidade (Figura 13) (75).

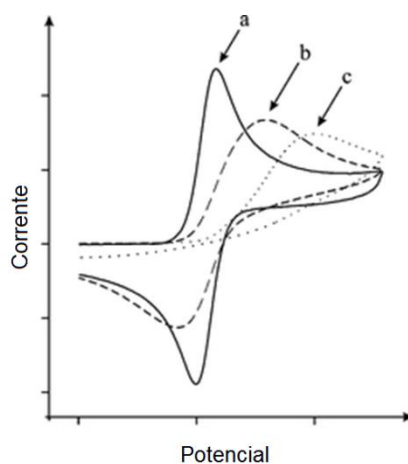


Figura 13: Voltamograma cíclico de um processo a) reversível; b) quase reversível; c) irreversível. Adaptado da ref.(76).

OBJETIVO

O objetivo principal do trabalho é aliar as propriedades do grafeno e das nanopartículas de cobre para produzir um dispositivo eletroquímico para detecção e quantificação do herbicida glifosato. Para tal, os objetivos específicos são:

- Desenvolver e caracterizar um sensor de óxido de grafeno reduzido modificado com nanopartículas de cobre;
- Otimizar o eletrodo GC/rGO/CuNPs para análise de glifosato;
- Aplicar o eletrodo na determinação de glifosato em amostras de água e urina sintética.

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamentos e técnicas

Os experimentos foram realizados utilizando as técnicas de voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) em um sistema eletroquímico Autolab modelo PGSTAT128N (Eco Chemie) equipado com o software NOVA 2.0. Foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro convencional de três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo (GC) modificado com o rGO-CuNPs como eletrodo de trabalho, eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e uma placa de platina como contraeletrodo, sempre com volume de 20,0 mL de eletrólito de suporte. Os dados foram tratados e os gráficos plotados no software Origin 8.0.

O eletrodo de trabalho foi modificado com o compósito produzido pelo método químico, cuja morfologia foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura acoplada a um canhão de elétrons (FEG-SEM), modelo Quanta 200 (FEI Company). A composição do material rGO-CuNPs, pH e os parâmetros voltamétricos da DPV foram otimizados em um intervalo de potencial de -0,3 a +0,2 V, sendo sempre escolhido o qual apresentou o melhor perfil voltamétrico, levando-se em conta as intensidades das correntes de pico anódica do cobre e considerando-se as leituras a partir do décimo voltamograma produzido (9 leituras para estabilização do eletrodo).

Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultra-pura obtida por um sistema Millipore com resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$. Foram usados reagentes de grau analítico sem purificação prévia, sendo o óxido de grafeno ($4,0 \text{ mg mL}^{-1}$) usado como precursor das sínteses e o padrão de glifosato da marca Sigma-Aldrich. As soluções utilizadas foram mantidas em refrigerador a 4°C após preparo e as medidas realizadas em temperatura ambiente. Foram preparadas soluções-estoque aquosas de glifosato e AMPA (2 e $2,9 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente), as quais foram posteriormente diluídas em diversas concentrações para os ensaios.

Para o estudo de interferentes, foram utilizadas soluções 100 ppm de cipermetrina e deltametrina (Sigma-Aldrich) solubilizadas em acetonitrila, diazinon e

malationa em n-hexano e mevinfós em acetona, provenientes de padrões analíticos da marca Accustandart.

Síntese dos compósitos rGO e rGO-CuNPs

Síntese do óxido de grafeno reduzido

Inicialmente preparou-se uma suspensão de GO e dodecil sulfato de sódio (SDS) na proporção 10:4 em meio de etanol que foi levada ao banho ultrassônico por 20 minutos. Adicionou-se então borohidreto de sódio (NaBH_4) em excesso (16 mg) e levou-se ao ultrassom por mais 20 minutos. A solução foi então centrifugada e limpa várias vezes com etanol. O rGO resultante foi seco a 60 °C. Após esta etapa, o rGO foi disperso em água ultrapura a uma concentração de 0,25 mg mL⁻¹.

Síntese do compósito rGO-CuNPs

O material utilizado no desenvolvimento do dispositivo foi preparado pelo método químico, por meio da redução do óxido de grafeno e do cobre (II), com obtenção de um compósito de óxido de grafeno reduzido modificado com nanopartículas de cobre metálico (rGO-CuNPs).

A síntese do compósito rGO-CuNPs foi realizada variando-se a porcentagem de cloreto de cobre (CuCl_2) em relação à massa inicial de GO (20mg), como mostra o Quadro3.

Quadro 3: Quantidade utilizada de cobre nos compósitos rGO-CuNPs.

Proporção de cobre no material produzido (%)	Massa de CuCl_2 (mg)
20	4
30	6
40	8
50	10

A solução de CuCl_2 foi adicionada gota a gota à suspensão de rGO sob agitação constante. O produto foi então centrifugado por 10 minutos com rotação de 3000 rpm e lavado com etanol por quatro vezes (o sobrenadante tornou-se incolor).

O precipitado foi transferido a uma placa de Petri (com adição de etanol para lavar o compósito aderido ao tubo) e secou em estufa a 60°C. O material seco resultante foi pesado e preparou-se uma suspensão em água ultrapura, na concentração de 1,0mg mL⁻¹, e levado à sonda ultrassônica por 1hora (até se obter uma suspensão homogênea, de coloração preta). A cada dia que o compósito foi utilizado, este foi levado novamente ao ultrassom de ponteira por 10 minutos para garantir a homogeneidade do filme usado no eletrodo.

Preparo dos eletrodos

A limpeza dos eletrodos de carbono vítreo (GC) foi feita por polimento seguido por banho em ultrassom. O polimento foi realizado em uma politriz com lixa d'água de carbeto de silício e suspensão aquosa de alumina 0,5 µm, até ser obtida uma superfície refletiva. Em seguida, o eletrodo foi levado a um banho de ultrassom em etanol por cinco minutos e em água ultrapura por mais cinco minutos. Ao eletrodo GC polido, limpo e seco à temperatura ambiente foram gotejados 10µL da suspensão a ser estudada (previamente homogeneizada no ultrassom por 20 minutos). Após secagem desta suspensão em temperatura ambiente, o eletrodo foi levado à célula eletroquímica para ser estudado por voltametria.

Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica

A caracterização eletroquímica dos eletrodos estudados foi realizada por CV em solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ contendo 1,0 mmolL⁻¹ do par redox Fe(CN)₆^{3-/4-} no intervalo de -0,3 a +1,0 V. Foram feitos estudos de comparação dos eletrodos utilizando os seguintes sensores: GC, GC/rGO e GC/rGO-CuNPs, para confirmar a modificação do rGO com CuNPs. Para esta caracterização eletroquímica, as concentrações usadas de rGO e rGO-CuNPs foram de 0,25 mg mL⁻¹ a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Também foram realizados estudos referentes ao perfil voltamétrico do cobre por CV na presença do glifosato. Para isso, utilizou-se o filme rGO-CuNPs na proporção de 30% de Cu e concentração de 1,0 mg L⁻¹, sendo feita uma comparação dos perfis voltamétricos na ausência e presença de glifosato. O intervalo de

potencial usado foi de -0,3 a 0,2 V, em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ como eletrólito de suporte (pH 7,4).

Otimização do compósito rGO-CuNPs

Estudo da proporção entre óxido de grafeno e cobre

Por DPV e em pH 7,4, os perfis voltamétricos dos compósitos com diferentes proporções de cobre foram comparados quanto à intensidade da corrente no potencial de oxidação do cobre II. Este procedimento foi realizado com e sem aplicação de um potencial de pré-concentração de -1,0 V por 60 segundos.

Potencial de pré-concentração

O potencial de pré-concentração foi otimizado por DPV no intervalo de -0,5 a -1,2 V, todos aplicados durante 60 s, em pH 7,4. Após identificar o melhor potencial de pré-concentração, o tempo de pré-concentração foi estudado por 15, 30, 45 e 60 s.

Estudo de pH

O pH foi otimizado por DPV, sendo utilizadas soluções tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ nos pHs de 6,5, 7,0 e 7,4, com aplicação do potencial de pré-concentração de -1,0 V por 60 s.

Otimização dos parâmetros voltamétricos

Os parâmetros da DPV foram estudados já com a proporção de cobre, o pH, potencial e tempo de pré-concentração otimizados, sendo sempre escolhido o melhor parâmetro para cada teste subsequente. Com todos na velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, foram testados intervalos de incremento de potencial de 1 a 10mV e amplitude de pulso de 10 a 100mV.

Detecção de glifosato e AMPA por DPV

A resposta voltamétrica do eletrodo GC/rGO-CuNPs foi testada em diferentes faixas de concentração de glifosato. Das 12 leituras de amostra em branco, foram considerados os 3 últimos voltamogramas. As faixas de concentração então

testadas foram entre $0,2 \cdot 10^{-9}$ e $11 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ na célula. Foram testadas varreduras nos sentidos anódico e catódico, sendo adotado o sentido anódico nos testes subsequentes.

Este procedimento foi feito em seguida com AMPA, através de adições de uma diluição 2 mmol L⁻¹, para se obter curvas relativas a concentrações entre 0,1 e 11 µmol L⁻¹ na célula. Para AMPA foi usada apenas a varredura anódica.

Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade com glifosato

Para avaliar a repetibilidade do sensor, foram realizadas 10 DPVs para estabilizar o eletrodo, 3 medidas da corrente de pico do cobre apenas em PBS e mais 10 medidas com 1 µmol L⁻¹ de glifosato na célula. Foram calculados os desvios-padrões das últimas 10 medidas em PBS e das medidas com analito.

O mesmo procedimento foi repetido em outros 5 eletrodos para avaliação da reprodutibilidade. Foi então calculado o desvio padrão dos desvios dos 6 eletrodos.

Avaliação do sinal após adição de concentrações elevadas de glifosato

Foi novamente avaliada a resposta voltamétrica do eletrodo GC/rGO-CuNPs na faixa de concentração de glifosato de 10 a 50 µmol L⁻¹ na célula. Esta concentração foi então aumentada para 10 µmol L⁻¹ para avaliar a resposta do sensor.

Detecção de glifosato por DPV em amostras de urina sintética

Para o estudo de matriz, uma amostra de urina sintética foi produzida a partir dos sais descritos no Quadro 4, pelo método de Laube *et al* adaptado (77).

Quadro 4: Sais usados no preparo da amostra de urina sintética.

Substância	Massa medida para 250 mL de solução (g)
CaCl ₂	0,21
NaCl	0,73
Na ₂ SO ₄	0,56
KH ₂ PO ₄	0,35
KCl	0,40
NH ₄ Cl	0,25
Ureia	6,25

O estudo de recuperação de analito foi realizado pelo método de adição de padrão, que consiste na adição de concentrações conhecidas de analito no sistema contendo amostra. Para isso, utilizou-se 19,0 mL de PBS pH 7,0 nas leituras da amostra em branco, e então foi acrescentado 1,0 mL de urina sintética contaminada com 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glifosato (de modo que a concentração na célula seria de 20 nmol L^{-1}). Em seguida foram feitas adições de glifosato, de modo que a concentração na célula ficasse em 30, 50 e 70 nmol L^{-1} . Foram realizadas medidas em triplicata.

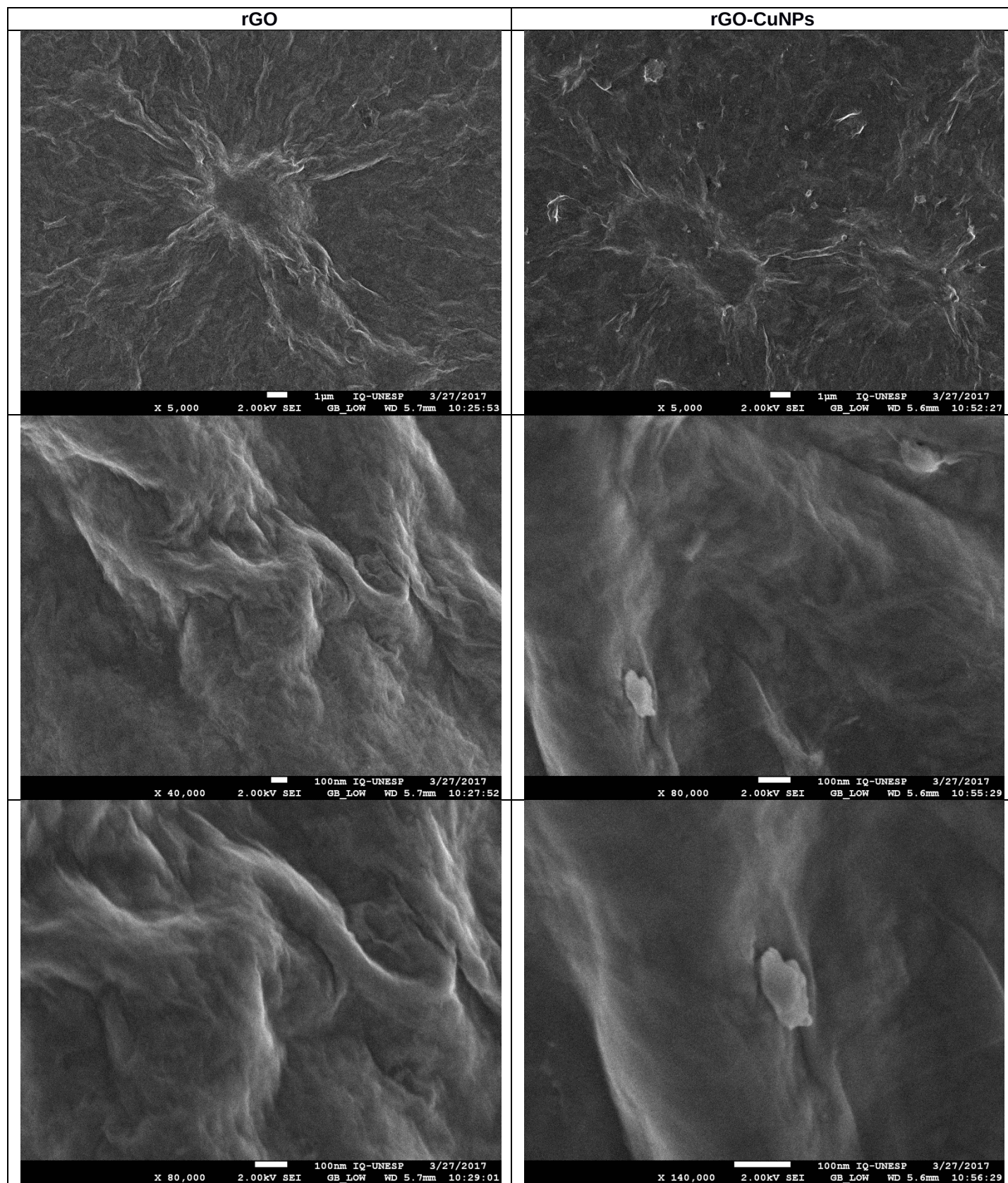
Estudo de interferentes

Para o estudo de interferentes foram utilizados 2 inseticidas da classe dos piretroides e 3 organofosforados: cipermetrina e deltametrina; diazinon, malationa e mevinfós. O comportamento voltamétrico dos interferentes foi avaliado em presença de uma concentração fixa de glifosato, em proporções de 0,5:1, 1:1 e 2:1. O mesmo procedimento foi adotado para todos os interferentes estudados, com leituras em triplicata: amostra em branco, 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glifosato, 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos interferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização Morfológica

A presença ou não de estruturas com dimensões nanométricas deve ser avaliada para que as propriedades do material possam ser relacionadas ao tamanho das partículas. Sendo assim, a morfologia do compósito produzido foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (FEG-SEM), sendo obtidas as imagens do Quadro 5. As imagens do rGO sem modificação exibem uma estrutura típica torcida, enrugada e com ondulações. Comparando-se as imagens de rGO e rGO-CuNPs é possível notar no compósito a presença de partículas dispersas ao longo da folha de rGO com dimensões próximas de 100 nm, os quais podem ser atribuídos às NPs de cobre.

Quadro 5:Imagens FEG-SEM da superfície dos filmes rGO e rGO-CuNPs 30%.

Caracterização Eletroquímica

Caracterização dos compósitos rGO e rGO-CuNPs

O compósito rGO-CuNPs cuja morfologia foi avaliada por microscopia também foi caracterizado eletroquimicamente (Figura 14A). A aplicação de um potencial de pré-concentração de -1,0 V por 60 s foi avaliada para otimização do pico de cobre (Figura 14B).

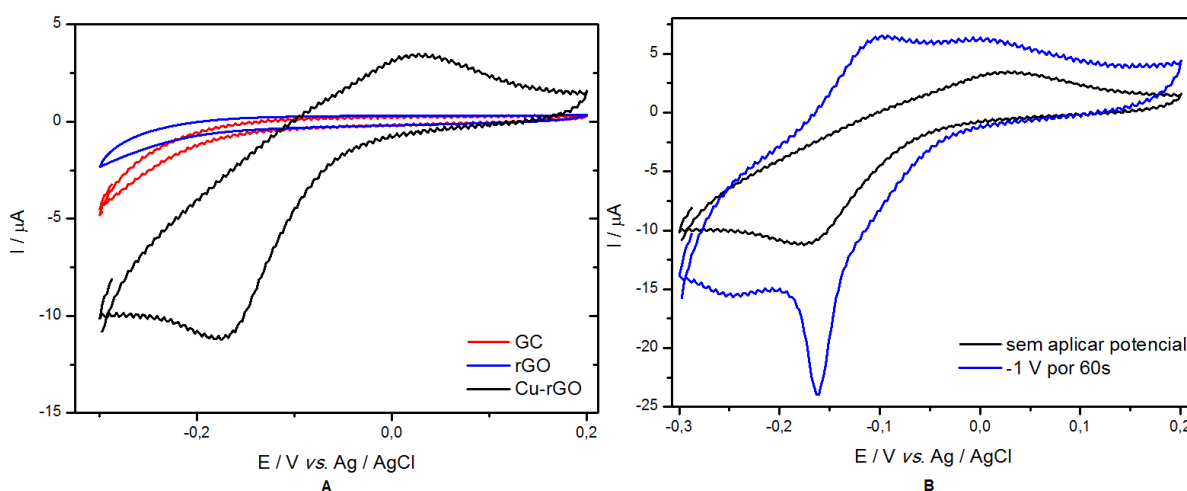


Figura 14: Caracterização dos eletrodos por CV em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4 e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, onde: (A) GC, GC/rGO e GC/rGO-CuNPs 30% e (B) GC/rGO-CuNPs 30% com e sem aplicação de potencial de pré-concentração de -1 V por 60 s.

Na Figura 14A, é possível observar que os eletrodos GC e GC/rGO estudados não apresentaram nenhum processo eletroquímico. Por outro lado, quando o eletrodo GC/rGO-CuNPs foi utilizado, a presença de cobre no filme é evidenciada pela formação de picos anódico e catódico em +0,03 V e -0,18 V, atribuídos à oxidação e redução do cobre. Em vários trabalhos (58–61), picos de oxidação próximos de 0 V são atribuídos à oxidação do cobre ($\text{Cu}^0 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$), podendo variar ligeiramente o potencial de oxidação de acordo com o pH da solução e a técnica empregada (CV, DPV).

Sempre se busca em voltametria otimizar as condições analíticas de modo a se obter a máxima corrente de pico, pois isso reflete uma melhor transferência de cargas e, conseqüentemente, melhor eficiência e sensibilidade para o sensor desenvolvido. Na Figura 14B, observa-se que a aplicação do potencial de pré-concentração proporcionou um aumento de cerca de 3 vezes na corrente de pico anódica do cobre, e por isso esse procedimento foi adotado e otimizado nos testes subsequentes.

Os perfis voltamétricos dos eletrodos GC, GC/rGO e GC/rGO-CuNPs (30%) também foram caracterizados eletroquimicamente em presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (Figura 15).

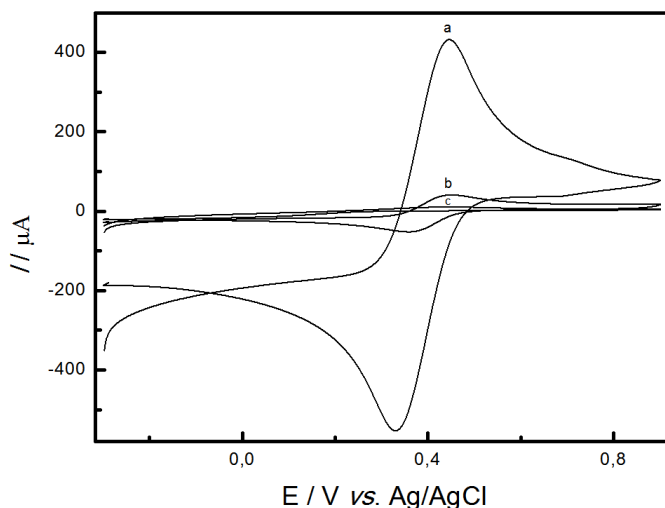


Figura 15: Caracterização dos eletrodos a) GC/rGO-CuNPs 30% , b) GC/rGO, c) GC por CV em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ferricianeto de potássio $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Os voltamogramas apresentaram picos de oxidação e redução bem definidos para os eletrodos estudados em presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$): em potenciais de aproximadamente $+449,5 \text{ mV}$ e $+356,7 \text{ mV}$ para o eletrodo GC/rGO, e em $+446,0 \text{ mV}$ e $+329,9 \text{ mV}$ para o eletrodo GC/GO (Tabela 1). Ademais, o eletrodo GC/rGO-CuNPs apresentou um aumento de I_{pa} e I_{pc} na ordem de 10 vezes em relação ao rGO e 40 vezes em relação ao GC. Esse aumento nas correntes de pico evidencia um efeito sinérgico ocorrido entre o rGO e as CuNPs, o que conferiu maior área superficial em relação aos dois primeiros eletrodos.

Tabela 1: Correntes e potenciais de pico anódicos e catódicos para os eletrodos estudados em solução em solução de H_2SO_4 contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Eletrodo	$I_{\text{pa}} (\mu\text{A})$	$E_{\text{oxi}} (\text{mV})$	$I_{\text{pc}} (\mu\text{A})$	$E_{\text{red}} (\text{mV})$	$\Delta I (\mu\text{A})$	$\Delta E (\text{mV})$	$I_{\text{pc}}/I_{\text{pa}}$
GC	10,3	447,1	-14,7	43,2	25	403,9	0,7
GC/rGO	41,0	449,5	-52,1	356,7	93,1	92,8	0,8
GC/rGO-CuNPs	432,2	446,0	-553,3	329,9	985,5	116,1	0,8

Também é possível observar na Tabela 1 que a modificação do eletrodo GC proporcionou melhora na reversibilidade do sistema, pois a razão entre as correntes e a diferença entre os potenciais de pico aproximaram-se dos valores teóricos ($I_{\text{pc}}/I_{\text{pa}} \sim 1$ e $\Delta E \sim 59 \text{ mV}$).

Avaliação dos compósitos na presença de glifosato

Os perfis voltamétricos dos eletrodos GC, GC/rGO e GC/rGO-CuNPs (30%) também foram comparados em ausência e presença de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glifosato(Figura16).

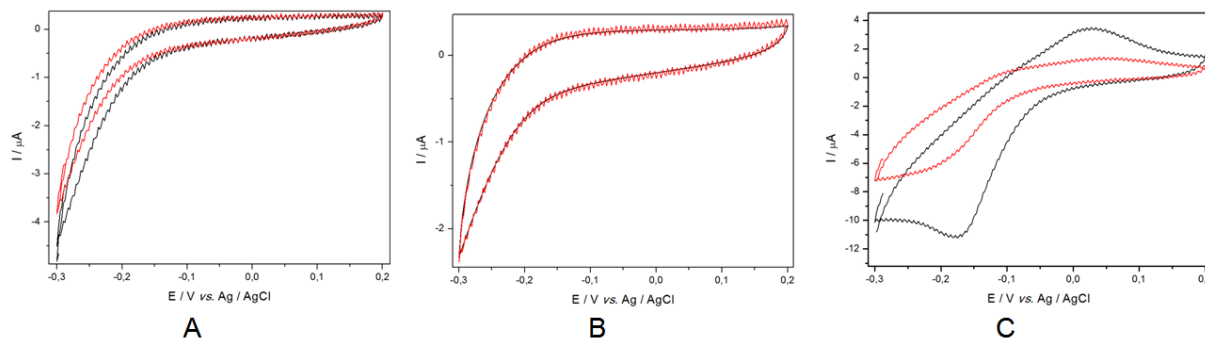


Figura 16: Perfis voltamétricos por CV em PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 dos eletrodos (A) GC, (B) GC/rGO e (C) GC/rGO-CuNPs (30%) em ausência (--) e presença de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glifosato (--), com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

A Figura 16C mostra que apenas o eletrodo com cobre apresentou alteração significativa no perfil voltamétrico com adição do analito, sendo observada uma diminuição das correntes de pico em presença do analito. Em outras palavras, o complexo Cu-glifosato inibe os picos anódico e catódico das CuNPs.

Em comparação aos trabalhos encontrados na literatura, o comportamento do sinal em presença de glifosato foi o oposto do previsto, sempre tendo sido relatado um aumento linear com a concentração (51,58–63,78). No entanto, por se tratar de um material diferente dos demais estudados, é possível indagar se este compósito segue o mesmo mecanismo, ou ainda se o mecanismo proposto é adequado neste caso.

A inibição do sinal de Cu com a formação do complexo Cu-glifosato pode ter ocorrido em consequência da redução da disponibilidade ao se coordenar com o metal, devido à diminuição da exposição nas CuNPs na superfície do eletrodo. A dimensão dessas partículas e o fato de elas estarem dispersas ao longo da folha de rGO cumpriria um fator predominante da inibição do sinal quando este se coordena a moléculas de glifosato.

Otimização do compósito rGO-CuNPs

Estudo da proporção entre óxido de grafeno e cobre

Foram testados por DPV compósitos produzidos em proporções de 20 a 50% de cobre em relação ao rGO, como mostra o gráfico na Figura 17.

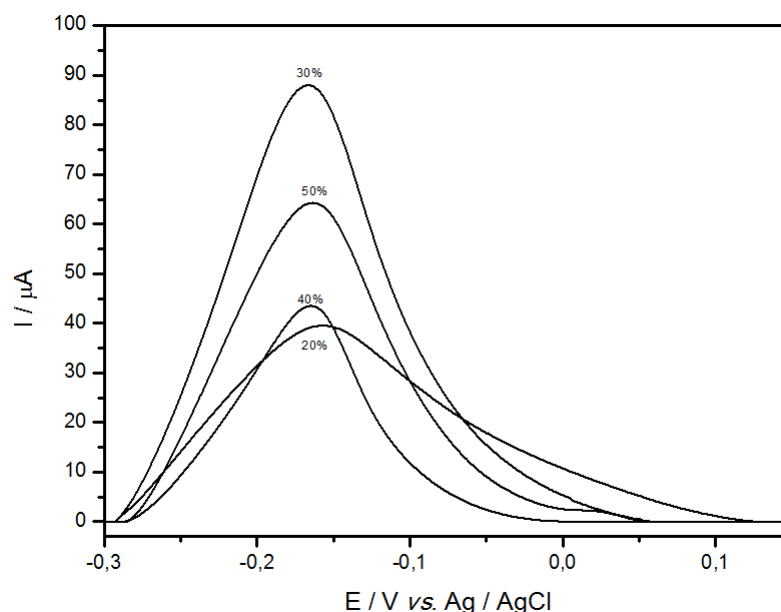


Figura 17: DPV de eletrodos GC/rGO-CuNPs com diferentes proporções de Cu em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4, com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 1 mV.

O eletrodo GC/rGO-CuNPs contendo 30% de cobre apresentou a maior corrente de pico, sendo então escolhido para os testes subsequentes. Não foi obtida uma relação direta entre o aumento da proporção de cobre e da corrente de pico (30%>50%>40%>20%), o que pode ser atribuído à diversidade na eficiência de síntese entre os compósitos produzidos. Para explorar melhor esse aspecto, seria necessário fazer um estudo com mais de uma síntese para cada tipo de material.

Potencial de pré-concentração

O potencial de pré-concentração e o intervalo de tempo de aplicação foram otimizados, e foram obtidas as maiores correntes de pico em -1 V por 45 s (Figura 18).

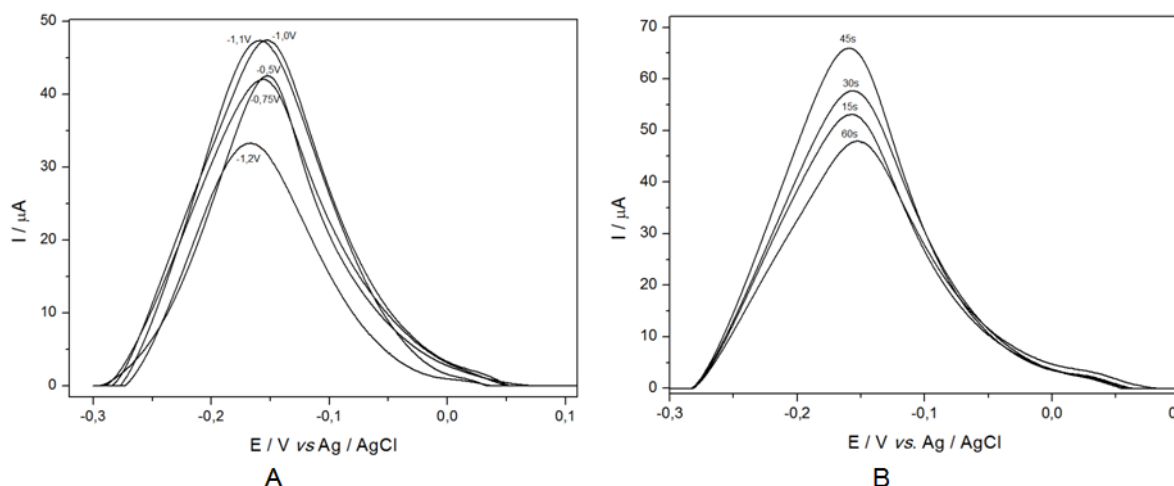


Figura 18: DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs (Cu50%) em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4, velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 100mV e incremento de potencial de 1mV, com aplicação de potencial de pré-concentração: (A) variado de -0,5 a -1,1 V por 60 s e (B) de -1,0 V com intervalo variado de 15 a 60 s.

O uso de potenciais de pré-concentração de analito são usualmente empregados para se melhorar a transferência de carga e obter a máxima corrente de pico possível dentro das características do material. A aplicação de um potencial fixo (negativo) antes de realizar a varredura anódica de potencial gera uma polarização que facilita a migração dos íons do analito do seio para a camada difusa da solução.

Estudo de pH

Como o complexo Cu-glifosato forma-se em pH próximo da neutralidade, foram testados valores de pH de 6,5 a 7,4, sendo no pH 7,0 obtida a maior corrente de pico (Figura 19).

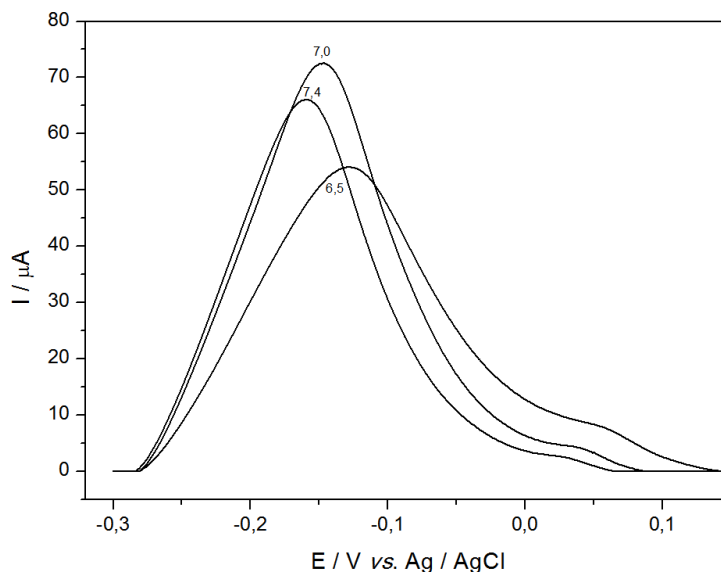


Figura 19: DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs (Cu50%) em PBS 0,2 mol L⁻¹, com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 1mV em diferentes valores de pH.

O aumento do pH desloca o pico para a esquerda, o que confirma o que foi observado na comparação entre os trabalhos usados como referência (51,58–63,78). A maior corrente de pico registrada foi em pH 7,0, sendo então usado nos testes subsequentes. Conforme já foi citado, a maior parte das moléculas de glifosato encontram-se na forma desprotonada em pH neutro (mostrado na Figura 2), o que facilita a formação do complexo com cobre.

Otimização dos parâmetros voltamétricos

Ainda com o intuito de se obter o melhor sinal analítico para o pico de oxidação do cobre, os seguintes parâmetros foram otimizados na DPV: velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, incremento de potencial de 6 mV e amplitude de pulso de 100 mV, como mostra a Figura 20.

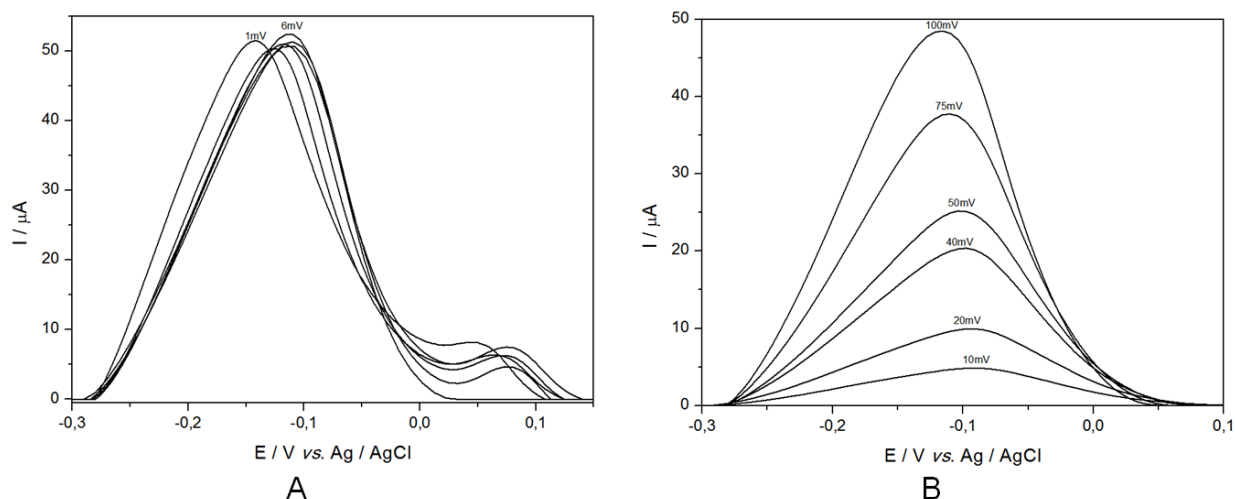


Figura 20: DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs (Cu50%) em PBS 0,2 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹ com (A) amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial variado de 1 a 10 mV e (B) incremento de potencial de 6 mV e amplitude de pulso variada de 10 a 100 mV.

Como já foi dito, a corrente faradaica obtida no voltamograma existe em função da transferência de carga da reação redox e da difusão do analito na solução. Mas, além disso, a velocidade com que se muda o potencial ao longo da varredura e a contribuição das correntes não-faradaicas também têm influência nesse processo, e por isso esses parâmetros (velocidade de varredura e incremento de potencial) devem ser ajustados.

Tal contribuição é evidenciada na Figura 20 por um leve deslocamento do potencial conforme estes parâmetros são ajustados. É possível observar na Figura 20A que o incremento de potencial exerce influência sobre o potencial, já que o pico mostra-se mais à direita quando comparado com 1 mV, que estava sendo usado até então. Por outro lado, variando-se a amplitude de pulso, o pico desloca-se para a esquerda com o aumento desta variável (Figura 20B).

Detecção de glifosato e AMPA por DPV

Foram testadas adições de glifosato em quatro faixas de concentração, entre 0,2 $\eta\text{mol L}^{-1}$ e 11 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e então plotadas curvas de DPV a partir das quais foram calculadas as taxas de inibição do sensor. A Figura 21 mostra uma das faixas de concentração testadas, onde é possível observar que os 3 pontos de triplicata mostraram-se muito próximos com diferenças acentuadas nas correntes de pico entre uma concentração e outra.

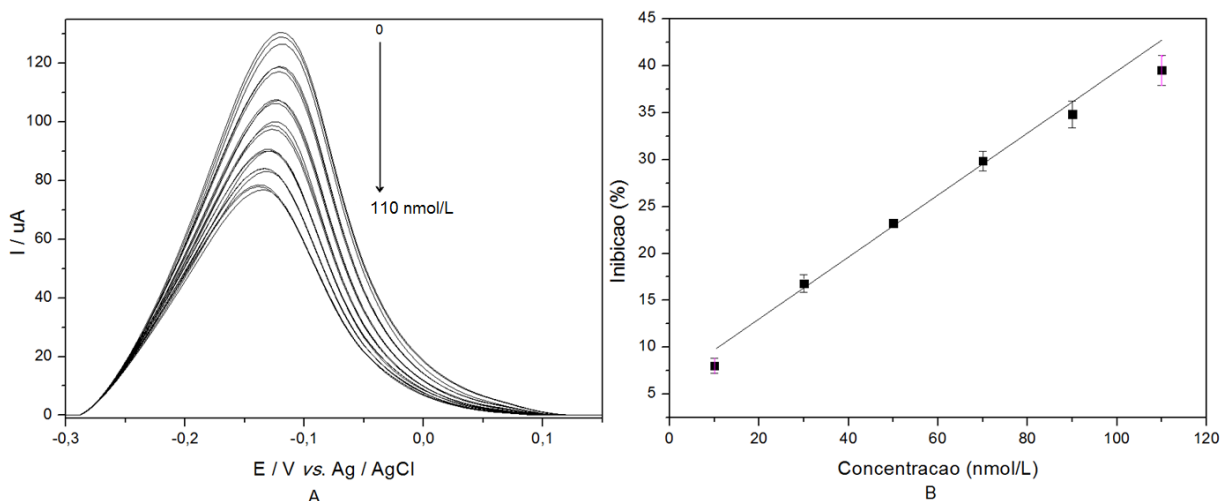


Figura 21: A) DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 6 mV nas concentrações de 0, 10, 30, 50, 70, 90 e 110 nmol L⁻¹ de glifosato; B) respectivas taxas de inibição.

A partir dos coeficientes linear (a) e angular (b) a seguinte equação foi obtida: $\% I = 6,42 + 0,33 [C]$, onde $R = 0,978$, $\%$, I é a taxa de inibição e C é a concentração de glifosato, sendo 6 o número de pontos na reta.

O complexo Cu-glifosato apresenta um discreto deslocamento no potencial em relação à oxidação do cobre (para a esquerda), o que pode ser explicado pelo fato de o glifosato se comportar como doador de elétrons, preenchendo os orbitais moleculares do metal (receptor de elétrons), o que diminui a energia necessária para o processo de oxidação do cobre. (79)

Também foram testadas adições de 0,2 a 4 nmol L⁻¹ por DPV em varredura catódica, como mostra a Figura 22. Nos dois modos de varredura de potencial, há muita proximidade entre as repetições e evidente diferença entre os pontos referentes às diferentes concentrações. No entanto, devido ao fato de a varredura catódica ter apresentado picos ligeiramente menos simétricos, o modo de varredura anódica foi adotado nos testes posteriores.

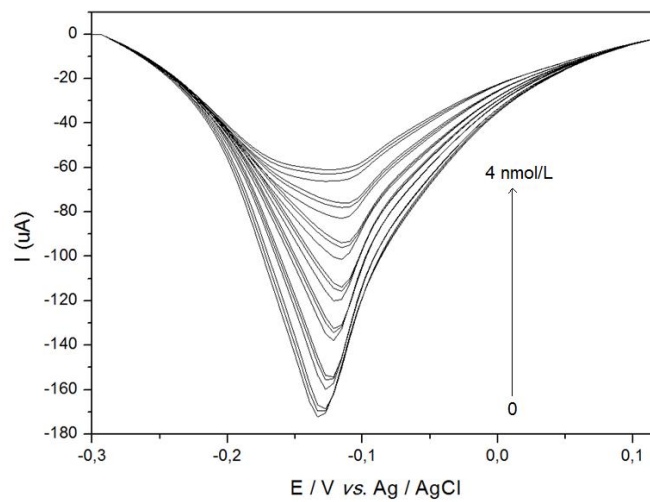


Figura 22: DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 6 mV, com varredura de potencial de +0,2 a -0,3V, nas concentrações de 0, 0,2, 0,5, 0,8, 1, 2 e 4 nmol.L⁻¹ de glifosato.

A taxa de inibição mostrou um aumento linear com a concentração entre 10 nmol L⁻¹ e 11 μmol L⁻¹ ($R > 0,9$), como mostra a Figura 23.

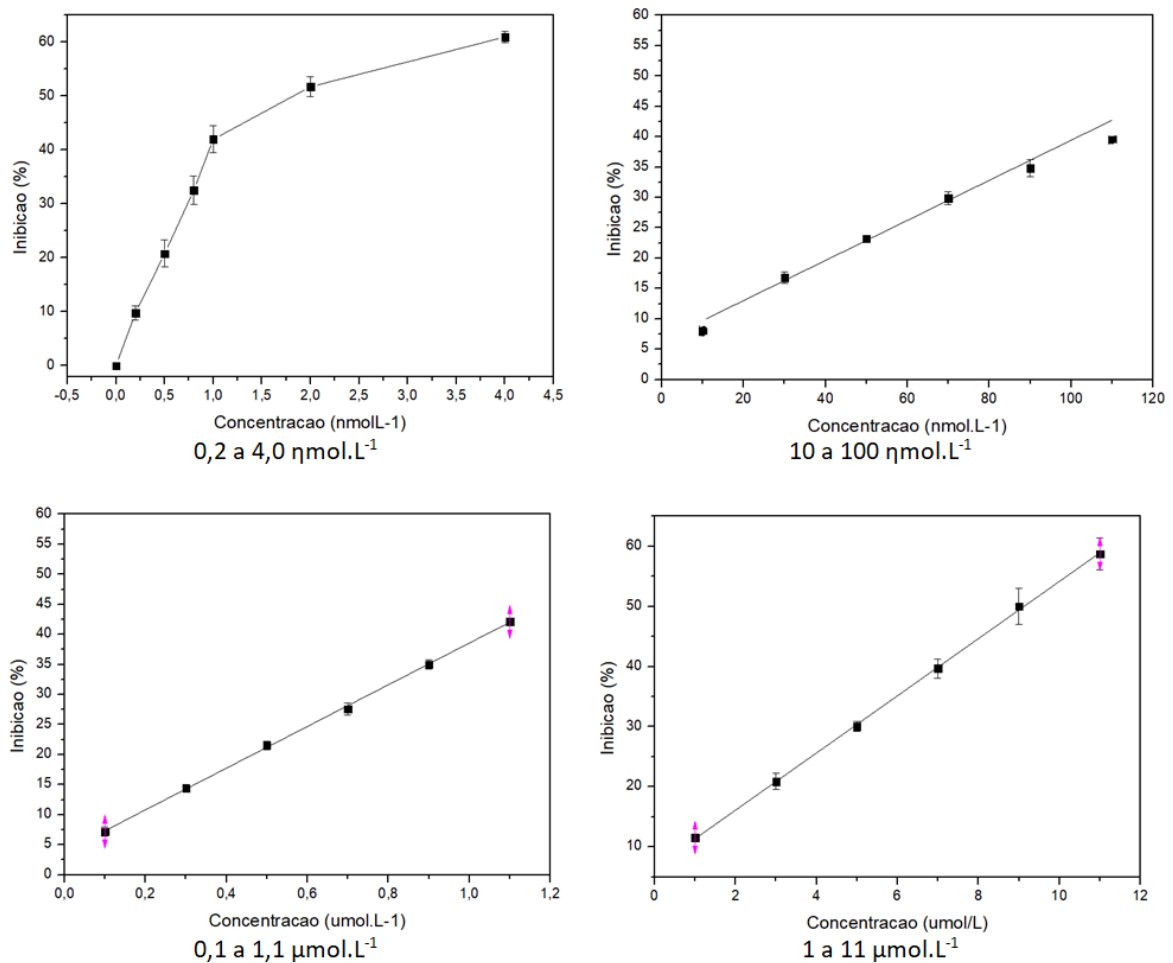


Figura 23: Taxas e inibição plotadas a partir das DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial nas faixas de concentração de 0,2 nmol L⁻¹ a 11 μmol L⁻¹.

As adições de glifosato ocasionam diminuições significativas nas correntes de pico, devido à inibição do sinal do cobre presente no eletrodo. No entanto, em concentrações abaixo de $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ observou-se que esta diminuição de corrente não é linear, e, portanto, não pode ser usada para quantificar glifosato.

Foram escolhidas faixas de concentração menores que a concentração mínima recomendada para aplicação pelos fabricantes em lavouras (da marca comercial mais utilizada), que é na ordem de 10 mmol L^{-1} (80), e que as faixas de concentração já estudadas por outros autores (das quais, o menor limite de detecção foi de $12 \mu\text{mol L}^{-1}$) (51,58–63,78).

O limite de detecção encontrado para o sensor foi de $24,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ele foi calculado a partir da curva de 10 a $110 \mu\text{mol L}^{-1}$ da seguinte forma: o desvio padrão das correntes de pico das últimas 10 leituras em branco foi multiplicado por 3 e dividido pelo coeficiente angular da reta. Foram realizados testes de repetibilidade e reprodutibilidade, sendo encontrados os valores de 2,13 e 0,33%, respectivamente, o que mostra desvios relativos pequenos entre os diferentes sensores utilizados e medidas realizadas.

Da mesma forma também foram plotadas duas figuras de mérito para AMPA nas faixas de concentração de $0,1$ a $1,1$ (Figura 24a) e 1 a $11 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 24b). Foram escolhidas as mesmas faixas de concentração que, para o glifosato, exibiram linearidade.

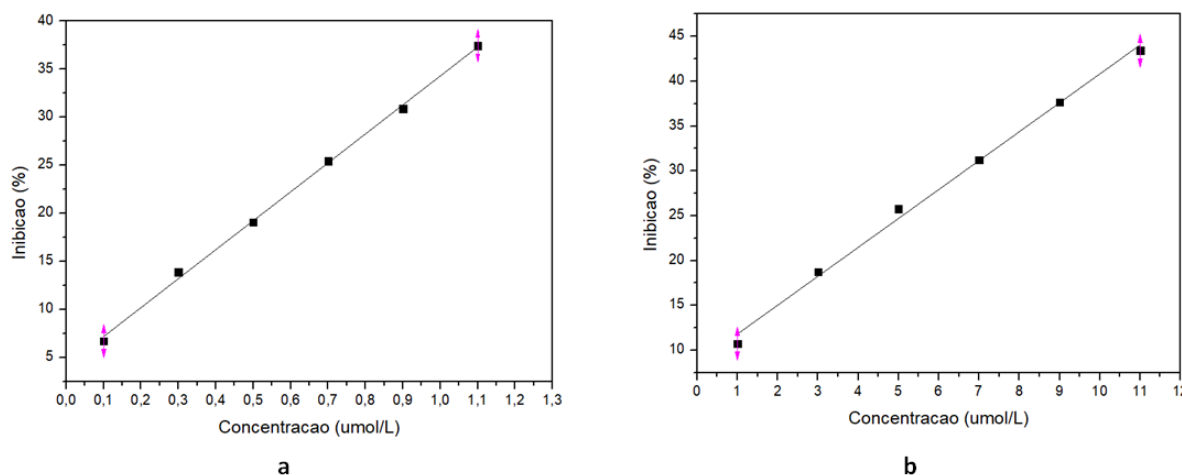


Figura 24: Taxas e inibição plotadas a partir das DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial nas faixas de concentração de a) $0,1$ a $1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e B) $1,1$ a $11 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AMPA.

As curvas de inibição obtidas para AMPA apresentam o mesmo perfil do observado com glifosato. De fato, era esperada essa semelhança no comportamento

eletroquímico, já que se trata de moléculas muito semelhantes: a presença de grupo fosfonato torna a molécula de AMPA também susceptível à produção de complexo com o cobre. Isso mostra que o sensor pode ser usado para detectar ambos simultaneamente, mas de forma não seletiva. Os testes subsequentes foram realizados apenas com glifosato.

Avaliação do sinal após adição de concentrações elevadas de glifosato

A resposta voltamétrica do eletrodo GC/rGO-CuNPs na faixa de concentração de glifosato de 10 a 50 $\eta\text{mol L}^{-1}$ na célula mostrou-se linear. Quando esta concentração foi aumentada para 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a resposta do sensor não apresentou queda abrupta na corrente de pico, como era esperado (Figura 25).

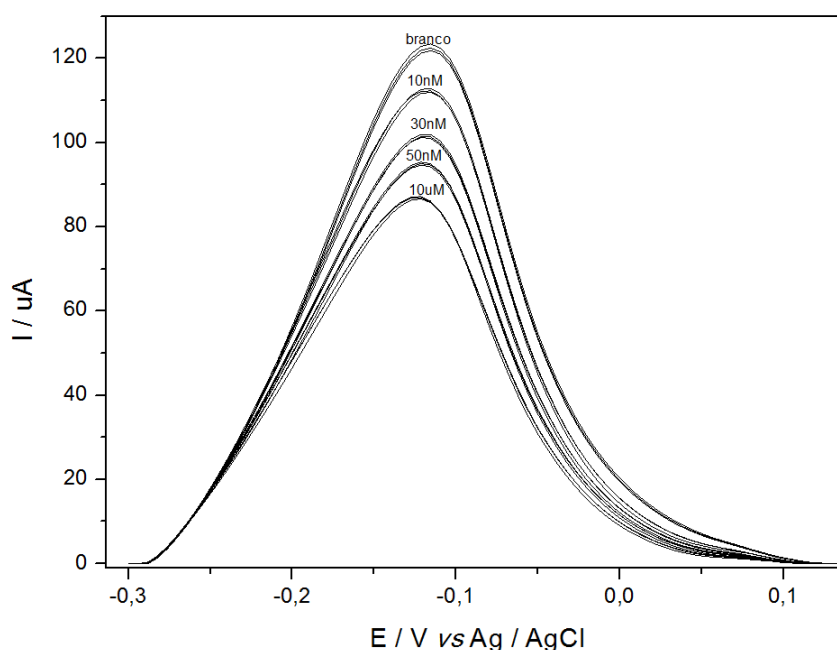


Figura 25: DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial de 6 mV nas concentrações de 0, 10, 30, 50, $\eta\text{mol L}^{-1}$ e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glifosato.

O comportamento observado na Figura 25 mostra quedas de corrente uniformes com adições abruptas de glifosato, o que seria desfavorável para quantificação se o método utilizado fosse pela quantificação por curva analítica. Entretanto, esse efeito pode ser corrigido com o uso do método de adição de padrão na análise, no qual a faixa de concentração é ajustada pela concentração presente na amostra.

Estudo de interferentes

Para o estudo de interferentes foram escolhidos os inseticidas das classes dos piretroides e organofosforados com base na ocorrência nos pacientes do ambulatório do CEATOX – IBB - UNESP. A influência da cipermetrina, deltametrina, diazinon, malationa e mevinfós na corrente de pico anódica foi avaliada e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Efeito de alguns agrotóxicos na inibição de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ glifosato em condições otimizadas por DPV, quando comparado com a solução que não contém o interferente.

Interferente	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	% do sinal de glifosato*
Cipermetrina	0,5	1,84
	1,0	1,84
	2,0	11,95
Deltametrina	0,5	2,91
	1,0	9,43
	2,0	15,34
Diazinon	0,5	7,57
	1,0	15,03
	2,0	22,50
Malationa	0,5	11,08
	1,0	17,97
	2,0	26,24
Mevinfós	0,5	9,38
	1,0	17,20
	2,0	22,97

*em relação a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glifosato em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, sem interferente

O método é sujeito a interferências, mas através do método de adição de padrão é possível minimizar a contribuição destas moléculas na inibição do pico provocada pelo glifosato. Como esperado, os organofosforados apresentaram interferência mais significativa, o que pode ser explicado pela semelhança estrutural com o glifosato (mostrado na Figura 26): a presença de regiões com possibilidade de se ligarem ao cobre ou competirem com o glifosato pelo metal, provavelmente através do fosfonato.

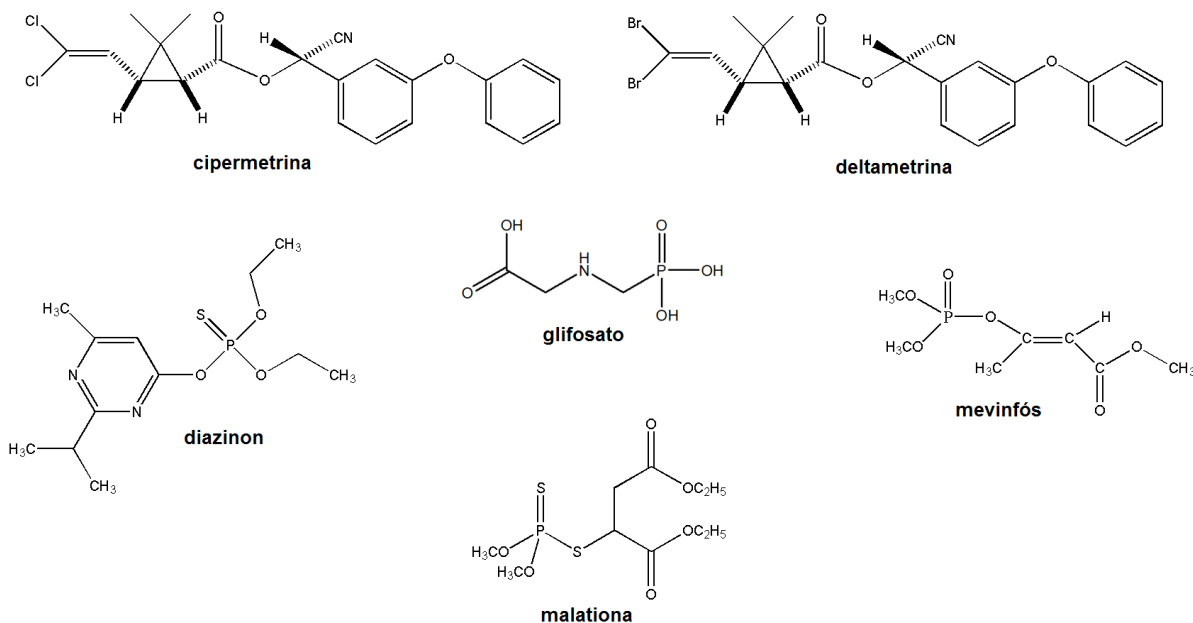


Figura 26: Estruturas moleculares do glifosato e dos interferentes utilizados.

Análise de glifosato em amostra de urina sintética

O estudo de recuperação de analito foi realizado pelo método de adição de padrão. Após a leituras em branco, foi acrescentada urina sintética enriquecida com $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glifosato (que, ao ser diluída na célula, ficaria com 20 nmol L^{-1}). Foram feitas 3 adições de glifosato, de modo a se obter 30 , 50 e 70 nmol L^{-1} , e os voltamogramas podem ser comparados na Figura 27.

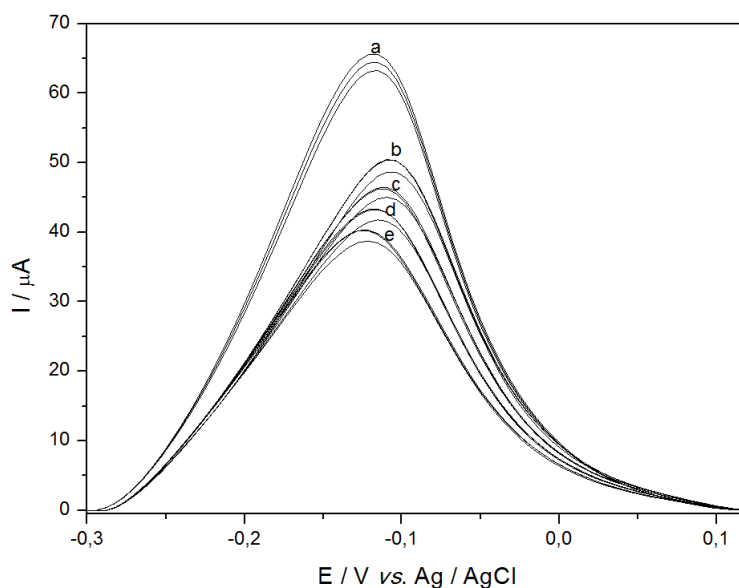


Figura 27:DPVs dos eletrodos GC/rGO-CuNPs 30% em PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} , amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial variado de 6 mV , onde a é a amostra em branco, à qual foram então adicionados: b) urina sintética + 20 nmol L^{-1} de glifosato; c,d e e- 30 , 50 e 70 nmol L^{-1} de glifosato, respectivamente.

O deslocamento dos picos para a direita evidencia o efeito de matriz, além de uma mudança na composição iônica no eletrólito de suporte. A partir das correntes de pico da Figura 27 foi plotada a figura de mérito exposta na Figura 28.

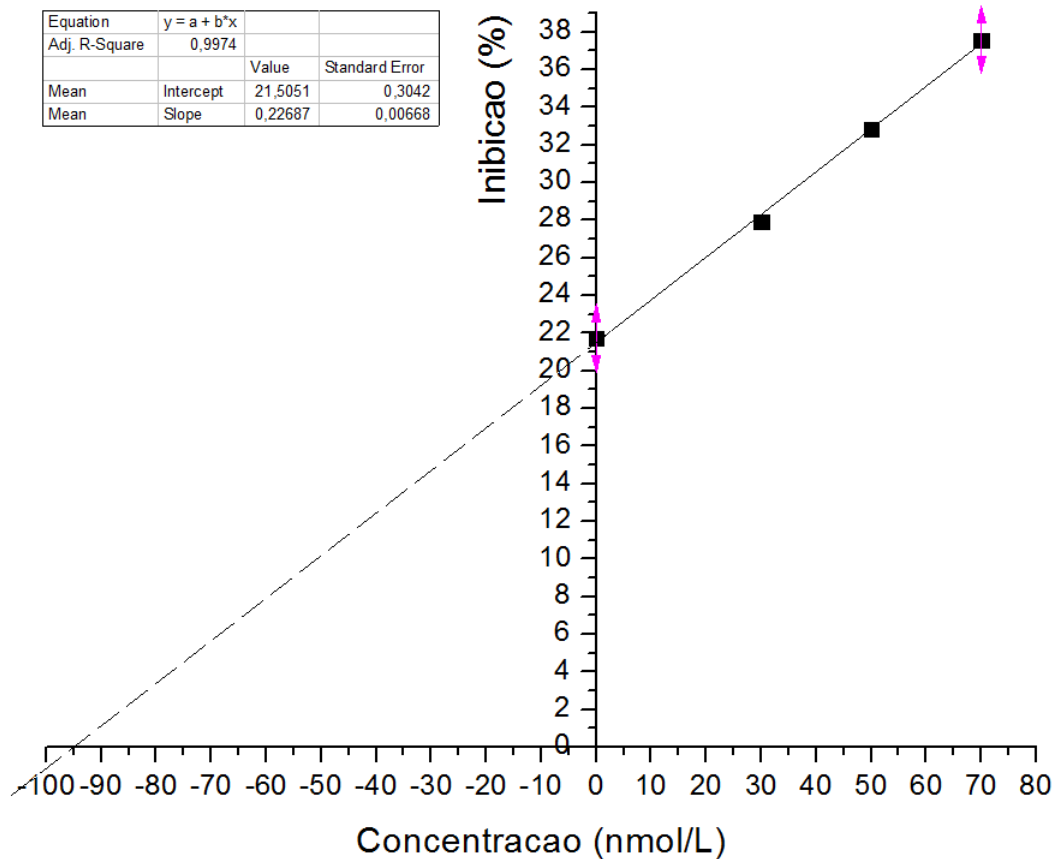


Figura 28: Taxas e inibição plotadas a partir das DPVs do eletrodo GC/rGO-CuNPs 30% em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de potencial na faixa de concentração de 30 a 70 ηmol L⁻¹.

$$\text{slope} = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$$

$$0,22687 = (21,5051 - 0) / (0 - x)$$

$$\underline{X = 94,8 \eta \text{mol L}^{-1}}$$

Embora a figura de mérito obtida tenha se apresentado linear ($R > 0,99$), a concentração encontrada (94,8 ηmol L⁻¹) para amostra contaminada foi bem distante do real (20 ηmol L⁻¹). Portanto, ainda são necessários mais estudos para tornar o sensor viável do ponto de vista quantitativo nesta faixa de concentração para análise em urina.

CONCLUSÃO

O método químico usado para a síntese dos materiais mostrou-se eficiente para a produção de nanopartículas de cobre e modificação do óxido de grafeno reduzido. O eletrodo GC/rGO-CuNPs apresentou maior área superficial em comparação aos eletrodos GC e GC/rGO. Por DPV, em 0,2 mol L⁻¹ PBS pH 7,0, utilizando os seguintes parâmetros otimizados: proporção de cobre de 30% em relação ao rGO, 100 mV de amplitude de pulso, incremento de potencial de 6 mV, velocidade de varredura de 10 mVs⁻¹ e potencial e tempo de pré-concentração de -1V por 45s, as respostas voltamétricas obtidas puderam ser relacionadas à inibição das correntes de pico anódico do cobre em relação ao acréscimo de glifosato nas faixas de concentração de 10 a 110 ηmol L⁻¹, 0,1 a 1,1 μmol L⁻¹ e 1 a 11 μmol L⁻¹ de glifosato. O compósito sintetizado é capaz de detectar glifosato e o sensor desenvolvido mostrou-se promissor para determinação de glifosato em meio aquoso, sendo ainda necessários estudos adicionais acerca do mecanismo da reação que ocorre entre o eletrodo e o analito.

REFERÊNCIAS

- 1 Martins, J. **Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) - Balanço 2016 Perspectiva 2017**. 2016.
- 2 Veiga, M.M. Agrotóxicos : eficiência econômica e injustiça socioambiental Pesticides : economic efficiency and social and environmental injustice. **Ciência e saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 145–152, 2007.
- 3 Carneiro, F.F.; Rigotto, R.M.; et al. **Dossiê ABRASCO: Um Alerta sobre os Impactos dos Agrotóxicos na Saúde**. 2015.
- Cassal, V.B., Azevedo, L.F. De, Ferreira, R.P., Gonçalves, D., & Simão, R.S. (2014). Agrotóxicos : uma revisão de suas consequências para a saúde pública. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Digital (REGET)*, 437–445.
- 5 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) - Relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012**. 2014.
- 6 Benbrook, C.M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 1–15, 2016.
- 7 Rizzardi, M.A.; Fleck, N.G.; et al. Competição por Recursos do Solo entre Ervas Daninhas e Culturas. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 707–714, 2001.
- 8 Toni, L.R.M.; Santana, H. de; et al. Adsorção de Glifosato sobre Solos e Minerais. v. 29, n. 4, p. 829–833, 2006.
- 9 Amarante Junior, O.P. de; Brito, N.M.; et al. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Revista Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.
- 10 Kruse, N.D.; Trezzi, M.M.; et al. Herbicidas Inibidores da EPSPS: Revisão De Literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 1, n. 2, p. 139–146, 2000.
- 11 Duke, S.O.; Powles, S.B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, p. 319–325, 2008.
- 12 Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: 2011.
- 13 Coutinho, C.F.B.; Mazo, L.H. Complexos Metálicos com o Herbicida Glifosato: Revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038–1045, 2005.
- 14 Liu, C.M.; McLean, P.A.; et al. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1799–1804, 1991.
- Oliveira Cavalli, V.. (2013). Alterações Bioquímicas Induzidas pelo Herbicida Glifosato-Roundup sobre Células Testiculares de Ratos Pré-Púberes. *Dissertação submetida ao Programa de Pós- Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para*, 1.
- 16 Araújo, A.S.F. de; Monteiro, R.T.R.; et al. Biodegradação de glifosato em dois solos brasileiros. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba**, v. 13, p. 157–164, 2003.
- 17 Annett, R.; Habibi, H.R.; et al. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 458–479, 2014.
- 18 Souza, T.A. de; Matta, M.H.R.; et al. Estudo de recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1372–1376, 2006.
- 19 Bailey, D.C.; Todt, C.E.; et al. Chronic exposure to a glyphosate-containing pesticide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 57, n. August 2017, p. 46–52, 2018.

- 20 Amarante Junior, O.P. de; Brito, N.M.; et al. Métodos de Extração e Determinação do Herbicida Glifosato: Breve Revisão. **Revista Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 420–428, 2002.
- Amaral, L.M.S.D.A. (2013). Análise crítica dos valores de Ingestão Diária Aceitável estabelecidos para praguicidas no Brasil, em relação as agências internacionais e a Agência Agência de Proteção Ambiental Americana, e suas implicações na avaliação do risco.
- 22 Boerboom, C.M.; Wyse, D.L.. Influence of Glyphosate Concentration on Glyphosate Absorption and Translocation in Canada Thistle (*Cirsium arvense*). **Weed Science Society of America**, v. 36, n. 3, p. 291–295, 1988.
- 23 Edge, C.B.; Gahl, M.K.; et al. Laboratory and field exposure of two species of juvenile amphibians to a glyphosate-based herbicide and *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Science of the Total Environment**, v. 444, p. 145–152, 2013.
- 24 Herbert, L.T.; Vázquez, D.E.; et al. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **The Journal of Experimental Biology**, v. 217, p. 3457–3464, 2014.
- 25 Simpson, E.R.; Mahendroo, M.S.; et al. Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis *. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 3, p. 342–355, 2014.
- 26 Gasnier, C.; Dumont, C.; et al. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184–191, 2009.
- 27 Thongprakaisang, S.; Thiantanawat, A.; et al. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 129–136, 2013.
- 28 International Agency for Research on Cancer **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - volume 112: Some organophosphate insecticides and herbicides - Glyphosate**. 2017.
- 29 Costa, V.I. do B. da; Mello, M.S. de C. de; et al. Exposição ambiental e ocupacional a agrotóxicos e o linfoma não Hodgkin. **Saúde em Debate**, v. 41, n. 112, p. 49–62, 2017.
- 30 Schinasi, L.; Leon, M.E. Non-hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 4, p. 4449–4527, 2014.
- 31 Attar, E.; Bulun, S.E. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 5, p. 1307–1318, 2006.
- 32 International Agency for Research on Cancer IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. **Environmental Health**, v. 112, n. 1, p. 425–433, 2015.
- 33 US Environmental Protection Agency **Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential EPA's Office of Pesticide Programs**. 2016.
- European Food Safety Authority (2015). Glyphosate: EFSA updates toxicological profile.
- 35 Tarazona, J. V.; Court-Marques, D.; et al. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 8, p. 2723–2743, 2017.
- Deutsche Welle: UE renova licença do glifosato por cinco anos. Disponível em <http://www.dw.com/pt-br/ue-renova-licen%C3%A7a-do-glifosato-por-cinco-anos/a-41551943>. Acesso em 06/02/2018.
- 37 Lopes, F.M.; Varela Junior, A.S.; et al. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 322–326, 2014.
- 38 Martínez, M.A.; Ares, I.; et al. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. **Environmental Research**, v. 161, n. September 2017, p. 212–219, 2018.

- 39 Negga, R.; Stuart, J.A.; et al. Exposure to glyphosate-and/or Mn/Zn-ethylene-bis-dithiocarbamate-containing pesticides leads to degeneration of c-aminobutyric acid and dopamine neurons in caenorhabditis elegans. **Neurotoxicity Research**, v. 21, n. 3, p. 281–290, 2012.
 - 40 Hansen, L.R.; Roslev, P. Behavioral responses of juvenile Daphnia magna after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. **Aquatic Toxicology**, v. 179, p. 36–43, 2016.
 - 41 Samsel, A.; Seneff, S. Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. **Entropy**, v. 15, n. 4, p. 1416–1463, 2013.
 - 42 Samsel, A.; Seneff, S. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 159–184, 2013.
 - 43 Samsel, A.; Seneff, S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. **Surgical Neurology International**, v. 6, p. 45–70, 2015.
 - 44 Castro, A.S. Avaliação da degradação do Herbicida Glifosato e o metabólito AMPA no solo da bacia do Arroio Donato – Pejuçara (RS). **Revista Atitude**, v. 12, p. 125–130, 2012.
 - 45 García De Llasera, M.P.; Gómez-Almaraz, L.; et al. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, n. 1–2, p. 139–146, 2005.
 - 46 Botero-Coy, A.M.; Ibáñez, M.; et al. Direct liquid chromatography – tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 157–165, 2013.
 - 47 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) **Relatório das Análises de Amostras Monitoradas no Período de 2013 a 2015 - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Brasília: 2016.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ANVISA: Agrotóxicos em Alimentos - Encontro avalia execução do Programa PARA em 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em 14/03/18.
- 49 Almeida, L.K.S. De; Chigome, S.; et al. A novel colorimetric sensor strip for the detection of glyphosate in water. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 206, p. 357–363, 2015.
 - 50 Chang, Y.; Zhang, Z.; et al. A simple label free colorimetric method for glyphosate detection based on the inhibition of peroxidase-like activity of Cu(II). **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 228, p. 410–415, 2016.
 - 51 Coutinho, C.F.B.; Coutinho, L.F.M.; et al. Direct determination of glyphosate using hydrophilic interaction chromatography with coulometric detection at copper microelectrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 592, n. 1, p. 30–35, 2007.
 - 52 Chang, Y.C.; Lin, Y.S.; et al. A highly selective and sensitive nanosensor for the detection of glyphosate. **Talanta**, v. 161, p. 94–98, 2016.
 - 53 Habekost, A. Rapid and sensitive spectroelectrochemical and electrochemical detection of glyphosate and AMPA with screen-printed electrodes. **Talanta**, v. 162, n. August 2016, p. 583–588, 2017.
 - 54 Zhao, P.; Yan, M.; et al. Determination of glyphosate in foodstuff by one novel chemiluminescence- molecular imprinting sensor. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 5, p. 1482–1486, 2011.
 - 55 Cesarino, I.; Cincotto, F.H.; et al. A synergistic combination of reduced graphene oxide and antimony nanoparticles for estriol hormone detection. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 210, p. 453–459, 2015.

- 56 Teófilo, R.F.; Reis, E.L.; et al. Experimental Design Employed to Square Wave Voltammetry Response Optimization for the Glyphosate Determination. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 865–871, 2004.
- 57 Rodrigues, M.A.; Silva, P.P.; et al. Cobre. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 3, p. 161–162, 2012.
- 58 Garcia, A.F.; Rollemberg, M. do C. Determinação Voltamétrica do Herbicida Glifosato em Águas Naturais Utilizando Eletrodo de Cobre. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1592–1596, 2007.
- 59 Sierra, E.V.; Méndez, M.A.; et al. Electrooxidación de glifosato sobre electrodos de níquel y cobre. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 220–226, 2008.
- 60 Pintado, S.; Montoya, M.R.; et al. Electrochemical determination of glyphosate in waters using electrogenerated copper ions. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 3, p. 2523–2530, 2012.
- 61 Moraes, F.C.; Mascaro, L.H.; et al. Direct electrochemical determination of glyphosate at copper phthalocyanine/multiwalled carbon nanotube film electrodes. **Electroanalysis**, v. 22, n. 14, p. 1586–1591, 2010.
- 62 Prasad, B.B.; Jauhari, D.; et al. Doubly imprinted polymer nanofilm-modified electrochemical sensor for ultra-trace simultaneous analysis of glyphosate and glufosinate. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 59, p. 81–88, 2014.
- Teófilo, R.F. (2003). Planejamentos Experimentais para a Otimização da Resposta Voltamétrica na Determinação do Herbicida Glifosato em Solo, Água e Vegetais.
- 64 Zarbin, A.J.G. Química de (Nano)Materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, 2007.
- Torre, A.P.B. (2007). Síntese e Caracterização de Nanoapartículas de Hexacianoferrato de Cobre e sua Aplicação em Biossensores de Glicose e Eletrodos Eletrocromicos.
- 66 Pastrana-Martinez, L.M.; Morales-Torres, S.; et al. Nanotubos e Grafeno: Os primos mais jovens na família do carbono! **Revista Química. Boletim de Química da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 128, p. 21–27, 2013.
- 67 Zarbin, A.J.G.; Oliveira, M.M. Nanoestruturas de Carbono (Nanotubos, Grafeno): Quo Vadis? **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1533–1539, 2013.
- 68 Bollella, P.; Fusco, G.; et al. Beyond graphene: Electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 89, p. 152–166, 2017.
- 69 Martin, P. Electrochemistry of Graphene: new horizons for sensing and energy storage. **Chemical Record**, v. 9, n. 4, p. 211–223, 2009.
- 70 Chen, J.; Yao, B.; et al. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. **Carbon**, v. 64, n. 1, p. 225–229, 2013.
- 71 Mendes, L.C.; Aquino, C.B. De; et al. **Síntese e Caracterização de Filmes Nanocompósitos entre Óxido de Grafeno e Azul da Prússia Visando a Aplicação em Sensores e Dispositivos Ópticos**. 2015.
- 72 Pacheco, W.F.; Semaan, F.S.; et al. Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.
- 73 Agostinho, S.M.L.; Villamil, R.F. V.; et al. O Eletrólito Suporte e Suas Múltiplas Funções em Processos de Eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 813–817, 2004.
- 74 Holler, F.J.; Skoog, D.A.; et al. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: 2009.
- 75 Silva, M.F.C.G. da Voltametria Cíclica — Aplicações ao Estudo de Mecanismos de Reações Induzidas por Transferência Electrónica. **Química**, v. 70, p. 20–26, 1998.
- 76 Brownson, Dale AC, Dimitrios K. Kampouris, and C.E.B. Graphene electrochemistry: fundamental concepts through to prominent applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41,

n. 21, p. 6944–6976, 2012.

77 Laube, N.; Mohr, B.; et al. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1–2, p. 367–374, 2001.

78 Sánchez-Bayo, F.; Hyne, R. V.; et al. An amperometric method for the detection of amitrole, glyphosate and its aminomethyl-phosphonic acid metabolite in environmental waters using passive samplers. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, n. 2, p. 125–131, 2010.

Valle, E.M.A., Coutinho, C.F.B., Luiz L Mazo, & Souza, D. De (2005). Interação de cobre (II) com o herbicida glifosato . Estudos realizados utilizando eletrodos sólidos. 1–2.

Roundup-Monsanto. Disponível em <http://www.roundup.com.br/produtos.php>. Acesso em 12/03/2018.