UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MARIA INÊS DA COSTA MARINHO

Desenvolvimento de eletrodo modificado com polímero de azul de metileno para a determinação eletroanalítica de glifosato.

São Carlos / SP
2010

MARIA INÊS DA COSTA MARINHO

Desenvolvimento de eletrodo modificado com polímero de azul de metileno para a determinação eletroanalítica de glifosato.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo

São Carlos / SP
2010

Dedicatória

Á meus pais, Conceição (in memorian) e Raymundo, por toda dedicação em buscar sempre o melhor para a minha vida. E pela compreensão em todos os momentos.

Aos meus irmãos que sempre me apoiam em todas as minhas decisões.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que hoje eu pudesse ser uma pessoa melhor do que antes de desenvolver este trabalho.

Agradecimentos

A Deus pela presença constante em minha vida e por me permitir desenvolver este trabalho no meio de pessoas tão especiais e amigas.

À minha família pelo apoio incondicional e por todo amor que me concede.

À Universidade de São Paulo pelo apoio e pela oportunidade para a realização deste curso.

À orientação do Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo pela paciência e profissionalismo, pelos ensinamentos e pela compreensão neste período de convivência.

Ao Prof. Dr. Sérgio Antonio Spinola Machado, pela amizade e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis durante o período do curso.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Aos amigos que já pertenceram ao grupo do GMEME e aos que ainda fazem parte do grupo agradeço pela amizade e colaborações durante o período de realização deste trabalho: Claudia Breda, Murilo Cabral, Fabiano, Milena, Eliana, Soninha, Claudia Razzino, Andressa, Gustavo, Raquel, Giancarlo, Katlin, Inês, Rafael, Samea, Eduardo, Juliana, Fernando, Diego, Kelly, Livia, Picon, Murilo Martinez, Dyovani, Pimpão, Ivana, Poliana, Érica, Deodato.

Ao Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME) pela estrutura utilizada durante este trabalho.

Ao Sr. João Tiengo, pela confecção de todos os materiais que necessitei e pelo profissionalismo, paciência e respeito.

Aos professores do IQSC, pelos ensinamentos transmitidos e experiências de vida.

Aos funcionários, da oficina mecânica e de vidraria pelo excelente trabalho.

À Andréia, Silvia e Gustavo por toda atenção e amizade, e a todas as secretárias da biblioteca.

Ao Marcelo Luiz Calegaro pela amizade, otimismo e conversas.

À minha amiga Luiza Nunes, pela força e otimismo durante todo o período do curso. E pelas conversas e conselhos que me ajudaram a superar os momentos difíceis.

Ao Murilo F. Cabral pela amizade, confiança e otimismo que foram essenciais para que eu pudesse seguir adiante para cumprir mais uma etapa na minha vida.

Aos amigos do curso Regina, Adriano, Janaína, Lisbeth, Julieta, e de república Jandira, Patrícia, Isi, Solange, Cibele, Beatriz, Hannah, pelas conversas e conselhos.

Epígrafe

“Bendiga ao Senhor em todas as circunstâncias. Peça que ele guie você em todos os caminhos, e que ele faça você ter sucesso em todas as iniciativas e projetos, pois nenhum povo possui a sabedoria. Somente o Senhor é quem dá seus bens”. [Tb 4-5,19]

RESUMO

MARINHO, M. I. C. **Desenvolvimento de eletrodo modificado com polímero de azul de metileno para a determinação eletroanalítica de glifosato**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

O presente trabalho descreve o preparo, a caracterização e o uso de eletrodo modificado com polímero de azul de metileno (PMB) imobilizado sobre a superfície de eletrodo de carbono vítreo (GCE-PMB) na análise do herbicida glifosato. O método utilizado para a preparação dos filmes do PMB foi a eletropolimerização. Os filmes preparados por este método apresentam características diferenciadas tais como robustez, estabilidade e propriedade redox satisfatória. As condições experimentais otimizadas foram a velocidade de varredura (50 mV s^{-1}), o intervalo de potencial ($-0,4$ a $+1,2 \text{ V}$), o número de ciclos (30) e o pH da solução do eletrólito suporte (pH 8). A solução de eletrólito suporte foi preparada a partir das soluções de tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e NaNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 8. A mesma foi utilizada no preparo da solução de azul de metileno (MB) ($0,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), no pré-tratamento do eletrodo de carbono vítreo (GC) por voltametria cíclica (CV) e no preparo de soluções para os estudos iniciais com o GCE-PMB. O pré-tratamento da superfície do eletrodo de GC foi realizado aplicando $+0,9 \text{ V}$ por 240 s seguido de várias varreduras cíclicas de $-0,4$ a $+1,0 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} até obter um perfil estável do voltamograma do eletrodo. Após o preparo do GCE-PMB, a atividade eletrocatalítica do eletrodo foi investigada para o Ácido Ascórbico (AA) e a L-Cisteína (L-Cys) por CV de $-0,4$ a $+0,6$. Foi observado aumento da corrente de pico e diminuição do sobrepotencial em relação ao eletrodo de GC. Nos estudos na presença do glifosato, o GCE-PMB apresentou resposta eletroquímica direta, por voltametria cíclica, para o glifosato ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,3) de $-0,4$ a $+0,6 \text{ V}$ e velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . A resposta voltamétrica apresentou picos anódico e catódico em 0,2 e 0, respectivamente. Para os estudos realizados por meio da técnica de voltametria de onda quadrada (SWV), os parâmetros frequência, amplitude e incremento de varredura foram otimizados. A partir desses estudos foi possível obter informações relevantes sobre a interação do GCE-PMB com o glifosato. Os resultados mostraram que é possível observar a eletroatividade do herbicida glifosato sobre uma superfície eletródica sem a presença de metais como agentes complexantes.

Palavras Chave: polímero de azul de metileno, glifosato, eletrodo quimicamente modificado.

ABSTRACT

MARINHO, M. I. C. **Development of poly(methylene blue) modified electrode for the determination eletroanalítica of glyphosate.** 2010. 81 f. Dissertation (Masters) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

This work describes the preparation, characterization and the use of the modified electrode with methylene blue polymer (PMB) immobilized onto the surface of glassy carbon electrode (GCE-PMB) in the analysis of the herbicide glyphosate. Concerning the methodology aspects, the method used for the preparation of the films PMB was the electropolymerization. The films prepared by this method present a differentiated characteristic such as robustness, stability and good redox properties. The optimized experimental conditions are the scan rate (50 mV s^{-1}), the potential range (-0.4 to +1.2 V), the number of cycles (30) and the pH of the supporting electrolyte (pH 8). The supporting electrolyte solution was prepared from phosphate buffer solutions (0.05 mol L^{-1}) and NaNO_3 (0.1 mol L^{-1}), pH 8. The same solution was used to prepare the solution of methylene blue (MB) ($0.25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), the pretreatment of the GC electrode by cyclic voltammetry (CV). It was also utilized in preparing solutions for the initial studies with GCE-PMB. The pre-treatment of the electrode surface of GC was performed, considering 0.9 V during 240 s, followed by several cyclic scans from -0.4 to 1.0 V (with scan rate of 50 mV s^{-1}) until a stable profile of the voltammogram. After preparing the GCE-PMB, electrocatalytic activity it was investigated for Ascorbic Acid (AA) and L-Cysteine (L-Cys) by CV from -0.4 to +0.6 V. It was observed increase in peak current and decrease the overpotential comparing to glassy carbon electrodes. The GCE-PMB presented direct electrochemical response, for glyphosate ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) in KCl 0.1 mol L^{-1} (pH 5.3) from -0.4 to +0.6 V and scan rate 50 mV s^{-1} . The voltammetric response showed anodic and cathodic peaks in 0.2 and 0, respectively. Using the square wave voltammetry (SWV), the parameters frequency, amplitude and scan increment were optimized. It was possible to find relevant information about the interaction between GCE-PMB and glyphosate. These results showed that is possible observe the electroactivity of glyphosate on a modified electrodic surface in absence of metals or complexing agents.

Keywords: poly(methylene blue), glyphosate, chemically modified electrode.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do herbicida glifosato.....	15
Figura 2 - Equilíbrios e constantes de dissociação do glifosato [15].....	17
Figura 3 - Estrutura química do monômero azul de metileno.....	26
Figura 4 - Reação de oxidação do NADH.....	27
Figura 5 - Reação de eletro-oxidação do azul de metileno.....	29
Figura 6 - Estrutura hipotética do polímero de azul de metileno.....	30
Figura 7 - Reação de oxidação eletroquímica do ácido ascórbico.....	31
Figura 8 - Fórmula estrutural da L-cisteína.....	32
Figura 9 - Potencial aplicado em função do tempo em voltametria cíclica, (E_i : potencial inicial, E_f : potencial final, $E_{máx}$: potencial máximo, E_{min} : potencial mínimo). Velocidade de varredura $v = dE/dt$	34
Figura 10 - Voltamograma cíclico do par redox do $[Fe(CN)_6]^{3-} [Fe(CN)_6]^{4-}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0, em eletrodo de carbono vítreo. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	34
Figura 11 - Forma de aplicação dos pulsos em voltametria de onda quadrada.....	36
Figura 12 - Voltamogramas esquemáticos de SWV onde: (1) representa um processo redox de sistema reversível e (2) de um sistema irreversível. I_1 – corrente reversa; I_2 – corrente direta; ΔI – corrente resultante ($\Delta I = I_2 - I_1$).....	37
Figura 13 - Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada: (1) eletrodo de trabalho, (2) eletrodo de referência, (3) eletrodo auxiliar, (4) entrada de N_2 (5) saída de N_2 . 45	
Figura 14 - Voltamogramas cíclicos da eletropolimerização de MB em eletrodo de GC (A) durante 30 ciclos: (—) 10, (—) 15, (—) 20, (—) 25, (—) 30. (B) durante 60 ciclos: (—) 30, (—) 35, (—) 40, (—) 45, (—) 50, (—) 55 e (—) 60. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	51
Figura 15 - Voltamograma cíclico da eletropolimerização de MB em eletrodo de GC. Solução de MB $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0, 30 ciclos. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	52
Figura 16 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo do eletrodo modificado com PMB em eletrólito suporte, tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para diferentes valores de pH: (—) 5,6, (—) 7,0, (—) 8,0, (—) 9,0. (B) Gráfico da corrente de pico em função do pH. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	56
Figura 17 - (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com PMB em eletrólito suporte, tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,6, por 100 ciclos. (B) Gráfico da corrente de pico em função do número de ciclos. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	57
Figura 18 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com PMB em eletrólito suporte, tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, durante quatro dias: (—) 1º, (—) 2º, (—) 3º, (—) 4º. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	58
Figura 19 - Voltamogramas cíclicos do GCE-PMB em diferentes soluções de eletrólito contendo AA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$: (—) GCE-PMB, (—) $NaNO_3$, (—) KNO_3 , (—) KCl . Velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	60
Figura 20 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$: (—) GC com adição de AA $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (—) GCE-PMB, (—) GCE-PMB com adição de AA $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	61
Figura 21 - (A) Voltamogramas cíclicos do AA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$: Velocidades de varredura: (—) 10, (—) 30, (—) 50, (—) 70, (—) 90, (—) 100, (—) 150, e (—) 200 mV s^{-1} . (B) Gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.....	63
Figura 22 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de GC: (—) em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3; (—) adição de L-cisteína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	64

Figura 23 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o GCE-PMB: (—) em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,3; (—) com adição de L-cisteína 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em solução de eletrólito suporte. Velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹	65
Figura 24 – (A) Voltamogramas cíclicos da L-cisteína 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol.L ⁻¹ . Velocidades de varredura: (—) GCE-PMB, (—) 20, (—) 50, (—) 70, (—) 100, (—) 150, (—) 200, (—) 250, (—) 300 mV s ⁻¹ . (B) Gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.....	66
Figura 25 - Voltamogramas cíclicos: (—) de uma solução KCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,3; (—) de uma solução glifosato 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,3. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	67
Figura 26 – (A) Voltamogramas cíclicos do glifosato 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,3. Velocidades de varredura: (—) GCE-PMB (—) 20, (—) 50, (—) 70, (—) 90, (—) 100, (—) 150, (—) 200, (—) 250, (—) 300 mV s ⁻¹ . (B) Gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.....	68
Figura 27 - Voltamograma de onda quadrada de uma solução de glifosato 5,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em solução KCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,3. Frequência 100 s ⁻¹ , amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Componentes da corrente: (—) corrente resultante, (—) corrente reversa e (—) corrente direta.....	70
Figura 28 - (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de 5,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de glifosato em solução KCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,3. Amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Valores de frequência: (—) 10, (—) 20, (—) 30, (—) 40, (—) 50, (—) 60, (—) 70, (—) 80, (—) 90 e (—) 100 s ⁻¹ (B) Gráfico de corrente de pico em função da raiz da frequência de pulsos aplicada.....	71
Figura 29 - (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de 5,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de glifosato em solução KCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,3. Frequência 100, incremento de varredura 2 mV. Valores de amplitude: (—) 10, (—) 20, (—) 30, (—) 40, (—) 50, (—) 60, (—) 70, (—) 80, (—) 90 e (—) 100 mV. (B) Gráfico de corrente de pico em função da amplitude de pulsos.....	72
Figura 30 - (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de 5,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de glifosato em solução KCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,3. Frequência 100, amplitude 50 mV. Valores de incremento de varredura: (—) 2, (—) 4, (—) 6, (—) 8, (—) 10. (B) Dependência da intensidade da corrente de pico com a amplitude.....	74
Figura 31 - Voltamograma de onda quadrada de uma solução de glifosato em solução KCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,3. Frequência 100 s ⁻¹ , amplitude 50 mV e incremento de varredura 2 mV. Valores de concentração em mol L ⁻¹ : (—) GCE-PMB; (—) 2,96 x 10 ⁻⁵ , (—) 5,92 x 10 ⁻⁵ , (—) 8,88 x 10 ⁻⁵ , (—) 1,18 x 10 ⁻⁴ , (—) 2,96 x 10 ⁻⁴ , (—) 4,14 x 10 ⁻⁴	75

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do herbicida glifosato.....	16
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do azul de metileno.	26
Tabela 3 - Procedência e pureza dos reagentes utilizados.	46
Tabela 4 - Parâmetros da voltametria de onda quadrada avaliados, intervalos de estudo e valores escolhidos.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	área geométrica do eletrodo (cm^2)
a	Amplitude (mV)
MB	Azul de Metileno
AA	Ácido Ascórbico
AMPA	ácido aminometilfosfônico
CV	Voltametria Cíclica
L-Cys	L-Cisteína
E	potencial
EQM	Eletrodo Quimicamente Modificado
f	Frequência (s^{-1})
I_p	Corrente de pico
GC	Carbono Vítreo
GCE-PMB	polímero de azul de metileno imobilizado sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo
LD	Limite de Detecção
PMB	Polímero de Azul de Metileno
PBS	Solução de tampão fosfato
SWV	Voltametria de Onda Quadrada
UV	Ultravioleta
Γ	recobrimento superficial total do eletrodo de carbono vítreo pelo polímero de azul de metileno
ΔE_s	Incremento de varredura (mV)

Sumário

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Considerações iniciais	13
1.2 Herbicida glifosato	15
1.2.1 Características físico-químicas.....	15
1.2.2 Modo de ação	17
1.2.3 Toxicidade.....	18
1.2.4 Metodologias de análise de glifosato	19
1.3 Eletrodos quimicamente modificados (EQMs) com polímeros condutores	22
1.3.1 Polímeros condutores	23
1.3.2 Eletropolimerização	25
1.3.3 Eletropolimerização Azul de Metileno.....	26
1.3.4 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com polímero de azul de metileno com Ácido Ascórbico e L-Cisteína.....	30
1.4 Técnicas voltamétricas	32
1.4.1 Voltametria cíclica	33
1.4.2 Voltametria de onda quadrada.....	35
1.5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	38

2. OBJETIVOS	43
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	44
3.1 Instrumentação.....	44
3.1.1 Célula Eletroquímica.....	44
3.1.2 Eletrodos.....	45
3.1.2.1 Eletrodos de referência e auxiliar	45
3.1.2.2 Eletrodo de trabalho	46
3.2 Reagentes	46
3.3 Soluções.....	47
3.4 Equipamentos	48
3.5 Metodologia	48
3.5.1 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com polímero de azul de metileno.	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Voltametria cíclica	50
4.1.1 Caracterização eletroquímica do filme do polímero de azul de metileno com Ácido Ascórbico e L-Cisteína.....	59
4.1.2 Estudo do eletrodo modificado com o polímero de azul de metileno na análise de glifosato	66
4.2 Voltametria de onda quadrada	69
4.2.1 Estudo da variação de frequência de pulsos	70
4.2.2 Estudo da variação da amplitude de pulsos	72
4.2.3 Estudo da variação de incremento de varredura	73
5. CONCLUSÕES.....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

O desenvolvimento de sensores com características importantes como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade é uma área de grande crescimento e interesse dentro da química analítica. Tal interesse deve-se à possibilidade de aplicar os mesmos em análises dos mais diversos tipos de amostras tais como ambiental, clínica e industrial. Uma forma de se alcançar um sensor com estas características é a modificação de eletrodos sólidos, que permite o desenvolvimento dos mais variados tipos de sensores.

O termo eletrodos quimicamente modificados (EQMs) foi utilizado para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, resultado da imobilização de um agente modificador sobre a superfície de um eletrodo base (substrato) com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução [1,2]. Por meio destas modificações na superfície, comparando com eletrodos convencionais, é alcançado maior controle de características do eletrodo e reatividade, fato que possibilita o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações.

Os polímeros condutores são muito utilizados no desenvolvimento de EQMs e possuem amplo potencial de aplicação como sensores biológicos e químicos, sendo um campo bastante explorado, principalmente, no desenvolvimento desses materiais [3-7].

Os eletrodos modificados com polímeros condutores apresentam-se como uma alternativa para o monitoramento de substâncias, como pesticidas e fertilizantes, em tempo real devido a algumas peculiaridades como alta estabilidade física e química. Além disso,

possuem uma ampla aplicação em estudos eletroanalíticos devido à versatilidade da polimerização eletroquímica.

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) [8], pesticidas são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou armazenamento de alimentos. Eles são bioativos e capazes de prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis que, de alguma maneira, possam interferir na produção, processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos, produtos agrícolas em geral, madeira e seus derivados.

Embora muitas mudanças e inovações surjam conforme as necessidades do mercado, entre elas o advento das culturas transgênicas, resistentes a algumas pragas, o uso de herbicidas é destacado, visto que a maioria destas inovações não impede o florescimento de ervas daninhas no campo [9]. Nos últimos anos, o número de trabalhos científicos com ênfase no comportamento dos herbicidas no ambiente tem demonstrado o aumento do interesse da sociedade em conhecer o destino final e o comportamento destes compostos, principalmente devido à preocupação com seus níveis tóxicos na água e em alimentos para o consumo humano, além dos constantes interesses ambientais [10].

Considerando-se a ampla utilização do glifosato, em todo o mundo, seu impacto no meio ambiente está se tornando mais permanente devido a sua acumulação. Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de métodos para a sua detecção e quantificação em amostras naturais [8,11].

1.2 Herbicida glifosato

O glifosato é um herbicida sistêmico, pós-emergente e não seletivo largamente utilizado na agricultura [12]. Pertence ao grupo químico dos aminoácidos fosfonados e tal como seu precursor, a glicina, apresenta comportamento zwitteriônico. Apresenta amplo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas. O glifosato pode ser usado em culturas de ameixa, cacau, café, citrus, maçã, nectarina, pêra, soja, uva, arroz, algodão, milho e em pastagens. Também pode ser empregado como dessecante em plantios diretos, como maturador de cana-de-açúcar e na eliminação de plantas aquáticas [11].

1.2.1 Características físico-químicas

N-(fosfonometil)-glicina é o nome reconhecido pela IUPAC ao herbicida de nome comum glifosato [13]. A fórmula estrutural do glifosato é mostrada na Figura 1.

Figura 1- Fórmula estrutural do herbicida glifosato.

As propriedades físico-químicas e toxicológicas do herbicida [14] estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do herbicida glifosato.

Propriedades	Características
Aparência	Sólido incolor
Nomenclatura (IUPAC)	[N-(fosfonometil)-glicina]
Peso Molecular	169,1 g mol ⁻¹
Solubilidade em água	12,0 g L ⁻¹ (20°C)
Solubilidade em solventes orgânicos	Insolúvel
Ponto de Fusão	200°C
Pressão de Vapor (Pa)	Desprezível
Categoria iônica	Anfótero
Classe toxicológica	III - Moderadamente tóxico

Segundo Sprankle e colaboradores [15], o glifosato apresenta uma sequência de equilíbrios com os seguintes valores do produto da constante de dissociação ácida (pK_a): 0,8; 2,6; 5,6 e 10,6, conforme mostrado na Figura 2. Os valores de pK_a têm efeito sobre a solubilidade do pesticida, e por meio do pK_a do pesticida e do pH do solo é possível prever a forma predominante (ionizável ou molecular) de um pesticida ácido. A mesma relação pode ser obtida usando pK_b para pesticidas alcalinos [16].

Em pH abaixo de 2,0, o glifosato apresenta carga líquida positiva, fato que contribui para a sua adsorção à argila e à matéria orgânica do solo que possui carga negativa [15]. Em pH 2,6, o glifosato tem carga zero e acima deste valor, sua carga negativa aumenta de acordo com o pH

do meio. Em pH 12, praticamente todo o glifosato está na sua forma trianiônica, sem nenhuma carga positiva.

Figura 2 - Equilíbrios e constantes de dissociação do glifosato [15].

1.2.2 Modo de ação

O modo de ação do herbicida glifosato consiste na alteração de diferentes processos bioquímicos vitais nas plantas, tais como a biossíntese de aminoácidos, de proteínas e de ácidos nucleicos [17]. O herbicida é absorvido pelo tecido vivo e transportado via floema,

através da planta para raízes e rizomas, e sua ação inibe enzimas específicas como a enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase (EPSP), suspendendo a síntese de aminoácidos aromáticos [18].

As plantas tratadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas, e devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive [11,19]. Mas as plantas culturais geneticamente modificadas não morrem por ser resistente a ação do herbicida. A soja transgênica, por exemplo, é resistente a esse herbicida e nisso consiste a simplificação do manejo de “ervas daninhas” para o agricultor.

1.2.3 Toxicidade

A toxicidade relativamente baixa do glifosato aos mamíferos tornou-o um dos herbicidas mais amplamente usados no mundo [20]. Porém, seu uso indiscriminado pode se tornar tóxico à fauna, à população microbiológica e ao homem, devido ao aumento das concentrações de seus resíduos no solo, na água e nos sedimentos.

O glifosato é absorvido via oral ou dérmica, sendo excretado principalmente pela urina. É irritante dérmico e ocular e pode causar danos hepáticos e renais, quando ingerido em doses altas.

1.2.4 Metodologias de análise de glifosato

A molécula de glifosato apresenta propriedades que dificultam a sua determinação como caráter anfótero, alta solubilidade em meio aquoso, baixa solubilidade em solventes orgânicos, alta polaridade, baixa volatilidade e ausência de grupos cromóforos que absorvam na região do ultravioleta e visível. As técnicas analíticas padrão para a detecção de pesticidas e seus resíduos são as cromatográficas (líquida de alta eficiência (CLAE), gasosa (CG) e de camada delgada (CCD)) [9,21,22]. Outras técnicas utilizadas são as espectroscópicas, como espectrometria de massa [23], infra-vermelho [24] e ultra-violeta [25]. Apesar de as técnicas serem muito sensíveis e precisas, a principal desvantagem é a necessidade de um pré-tratamento da amostra, levando a um maior tempo na realização das análises e a um gasto elevado de reagentes para a etapa de preparação das amostras.

Para a detecção de glifosato por meio de métodos ópticos são necessárias reações de derivatização, ou seja, modificações em sua estrutura, com a introdução de grupos cromóforos ou fluorescentes. Embora em alguns casos, tais modificações sejam feitas nas etapas de extração, na maioria das vezes, os procedimentos de derivatização são realizados em etapas que antecedem (pré-coluna) ou procedem (pós-coluna) a separação cromatográfica [9].

Jiang e Lucy [25] determinaram glifosato em água utilizando fluorescência induzida a laser e obtiveram um limite de detecção de $0,27 \mu\text{g L}^{-1}$. Chiu e colaboradores [26] analisaram glifosato em soja utilizando quimiluminescência e obtiveram limite de detecção de $0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$. Outras técnicas de detecção são condutividade [26] e fluorescência indireta [28].

A análise de glifosato utilizando técnicas eletroanalíticas é pouco explorada. O glifosato não apresenta resposta eletroquímica direta em eletrodo de mercúrio, ou seja, é polarograficamente inativo, uma vez que não apresenta grupos químicos que possam ser

reduzidos. No entanto, com os avanços no desenvolvimento de novos materiais para aplicações eletroanalíticas, como o baixo custo, a velocidade de análise e uma boa sensibilidade, em comparação à maioria das técnicas citadas, as técnicas eletroquímicas passaram a ser consideradas como uma importante e alternativa ferramenta para análises de compostos orgânicos diversos. Isto inclui a análise do herbicida glifosato por apresentar maior sensibilidade e simplicidade de análise [29].

Bronstad e Friestad [30,31] desenvolveram uma metodologia de análise de glifosato baseada na detecção de um derivado *N*-nitroso utilizando eletrodo de mercúrio. Neste método, a molécula de glifosato é derivatizada por meio da reação com nitrito de sódio e ácido clorídrico. Como resultado, ocorre a introdução de um grupo *N*-nitroso no grupo amino secundário, o qual é facilmente reduzido e pode ser determinado polarograficamente. Teófilo e colaboradores [32] desenvolveram uma metodologia de análise de glifosato utilizando voltametria de onda quadrada, com o mesmo procedimento de derivatização descrito anteriormente. O limite de detecção para o glifosato utilizando esta reação de derivatização varia entre 0,025 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹.

O glifosato apresenta três grupos funcionais (amínico, carboxílico e fosfônico), que podem formar fortes ligações coordenadas com íons metálicos, particularmente com os íons dos metais de transição [33]. A facilidade em coordenar como ligante tridentado coloca o glifosato numa posição privilegiada entre os herbicidas [21].

Coutinho e colaboradores [34] determinaram o glifosato por meio do estudo sobre a interação do cobre (microeletrodo de cobre) e glifosato por meio de técnicas voltamétricas. Os resultados obtidos mostraram que o herbicida dissolve a camada de óxidos, aumentando a corrente anódica do microeletrodo, levando a formação de um complexo solúvel entre Cu (II) e glifosato. Dessa forma, os autores desenvolveram uma metodologia de análise de glifosato utilizando detecção coulométrica com microeletrodo de cobre, aliada à cromatografia líquida

para análise em amostras de alimentos e água. O princípio de detecção foi baseado no acréscimo da corrente anódica de microeletrodo de cobre na presença de agentes complexantes, tais como glifosato, com a formação de um complexo solúvel de Cu (II). Os limites de detecção obtidos foram de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para sucos de frutas, $32 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$ para amostras de água e $53 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para amostras de soja.

A possibilidade de superfícies de materiais eletródicos comuns (Au, Pt, Hg, C, ligas metálicas, entre outros) poderem ser modificadas química e fisicamente ampliou as potencialidades analíticas dos métodos eletroquímicos devido a diversas aplicações possíveis de um EQM. Em particular, o uso de eletrodos modificados com polímeros condutores é interessante do ponto de vista analítico na determinação de herbicidas devido à grande versatilidade de polimerização e obtenção de filmes, mudança das propriedades redox, tanto pela variação do íon dopante bem como do analito e excelente estabilidade física e química. Além disso, os eletrodos modificados tem se revelado como bons materiais para o desenvolvimento de sensores químicos e eletroquímicos por suas características favoráveis como sensibilidade e boa propriedade redox [7].

Simões e colaboradores [7] estudaram a interação entre o glifosato e eletrodos de pasta de carbono modificados com polímeros condutores, polianilina e polipirrol, por métodos ópticos e eletroquímicos. Os resultados obtidos por estes autores mostraram que a interação acontece favoravelmente apenas para a polianilina, com pico de oxidação em 0,2 V. Além disso, mostraram que há uma relação direta entre a adsorção do pesticida e a resposta eletroquímica observada sobre este eletrodo modificado quimicamente.

1.3 Eletrodos quimicamente modificados (EQMs) com polímeros condutores

O termo EQM foi inicialmente utilizado na eletroquímica por Murray e colaboradores [35] na década de 70, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, deliberadamente imobilizadas em suas superfícies. O principal objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução [1,2] como uma forma de alterar a reatividade e a seletividade do sensor base, tornando as suas propriedades muito mais atraentes. Dessa forma, favorece o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas [36] até a transferência de elétrons para moléculas de interesse [37].

Dentre as funções básicas de um EQM estão interações seletivas e pré-concentração de um analito na camada modificadora, eletrocatalise de reações redox com transferência eletrônica lenta sobre o eletrodo base, permeseletividade para inibir interferentes, incorporação de biomoléculas, particularmente no desenvolvimento de biossensores e imunossensores, assim como sensibilidade, seletividade, estabilidade, reprodutibilidade e aplicabilidade superiores àquelas de um eletrodo base sem modificação [1].

Um EQM consiste de duas partes, isto é, o eletrodo base e a camada do modificador químico, que depende das características analíticas desejadas para o sensor. A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização escolhido. Entre os materiais convencionais mais utilizados podemos citar ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e pasta de carbono [1,38]. Todos estes materiais apresentam vantagens e desvantagens, as quais também são descritas na literatura [39]. A modificação pode ocorrer das mais diversas maneiras em que as

espécies eletroativas podem ser incorporadas ou imobilizadas nas superfícies destes eletrodos por métodos eletroquímicos ou químicos.

A preparação de polímeros por meio de métodos eletroquímicos é muito utilizada por apresentar vantagens como reprodutibilidade, simplicidade e pode ser realizada à temperatura ambiente [38].

A camada do modificador, geralmente, é eletroativa agindo como mediadora entre a solução e o eletrodo-substrato na transferência de elétrons. A sua atuação pode aparecer no voltamograma cíclico como um aumento do sinal analítico da espécie de interesse, deslocamento do potencial redox ou com o surgimento de um novo pico voltamétrico [40].

1.3.1 Polímeros condutores

O primeiro polímero condutor foi obtido em 1977 por F. Shirakawa com a colaboração dos professores A. MacDiarmid (Universidade da Pensilvânia) e A. Heeger (Universidade da Califórnia, Santa Bárbara) [5] pela exposição do poliacetileno, na forma isolante (condutividade, $\sigma = 10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$), a agentes dopantes, oxidantes ou redutores, tornando-o condutor elétrico intrínseco ($\sigma = 10^{-2} \text{ S cm}^{-1}$). Devido ao sucesso da síntese do poliacetileno foi iniciada a linha de pesquisa de polímeros condutores.

O estudo de polímeros condutores despertou um enorme interesse científico e tecnológico devido às diversas aplicações possíveis para esses materiais, como o desenvolvimento de dispositivos eletro-eletrônicos e sensores [41]. Por meio de processos de dopagem esses polímeros tornam-se eletroativos, possibilitando por meio de técnicas eletroquímicas a determinação de diversas substâncias [5].

Os polímeros condutores possuem um sistema de ligações simples e duplas alternadas ao longo da cadeia polimérica (elétrons π conjugado estendido) que podem ser modificados por processo químico ou eletroquímico denominado dopagem. A dopagem envolve a oxidação (retirada de elétrons) ou redução (adição de elétrons) à cadeia polimérica [5]. Os agentes dopantes podem ser moléculas neutras, compostos ou sais inorgânicos que podem facilmente formar íons, dopantes orgânicos e poliméricos. A natureza do dopante tem papel importante na estabilidade e condutividade dos polímeros condutores. Os polímeros intrinsecamente condutores mais comuns são polianilina, polipirrol, politiofeno, poliacetileno, poli(*p*-fenileno) e poli(*p*-fenileno sulfonado) [3].

A síntese de polímeros condutores pode ser realizada por meio da oxidação ou redução química ou eletroquímica de uma substância e podem apresentar a condutividade elétrica de um metal [5,42]. Assim, a escolha do método de síntese é importante uma vez que influencia na qualidade e propriedades finais do polímero.

A seleção do método de polimerização está relacionada com a aplicação a ser feita do polímero condutor que pode ser em diversas áreas tecnológicas como: baterias, eletrocatalise, sensores, etc. [4]. No entanto, a propriedade dos polímeros que despertou o interesse para o desenvolvimento dos mesmos é a capacidade de catalisar reações no eletrodo que favorece a cinética de processos de algumas espécies em solução [43].

Dentre as espécies químicas com propriedade eletrocatalítica, as azinas representam um grupo de corantes orgânicos que vem sendo amplamente usadas como indicadores redox e mediadores em vários ramos da bioquímica e bioeletroquímica [44]. Entre os corantes pertencentes a esse grupo destaca-se o azul de metileno, um corante fenotiazínico, relatado na literatura como mediador redox em processos eletrocatalíticos tanto em solução como imobilizado na superfície de um eletrodo base [44- 46].

1.3.2 Eletropolimerização

A síntese de polímeros condutores via eletroquímica, em particular por eletropolimerização, envolve a oxidação anódica de um monômero dissolvido em um eletrólito adequado por aplicação de um potencial externo, usualmente o potencial de oxidação do monômero, para formar espécies cátion-radical. A partir de reações de acoplamento são formados os oligômeros. Estes são insolúveis no eletrólito e o filme polimérico eletroativo é depositado sobre o eletrodo base. Devido à natureza oxidativa da eletropolimerização, o polímero depositado está na forma de seu estado oxidado e as cargas positivas ao longo do esqueleto estrutural do polímero são compensadas pelos ânions do eletrólito suporte [41,44].

A polimerização eletroquímica é amplamente usada devido a algumas vantagens: (1) é possível realizar a polimerização a temperatura ambiente, e microeletrodos ou eletrodos com área superficial grande podem ser usados; (2) o filme polimérico formado é aderente à superfície do eletrodo, e a sua espessura pode ser controlada na faixa de nanômetros a micrometros (3) as propriedades do polímero condutor podem ser amplamente controladas por variação das condições de polimerização eletroquímica [43].

Além disso, os polímeros obtidos por eletropolimerização possuem algumas propriedades únicas que os monômeros correspondentes nem sempre possuem e podem ser imobilizados na superfície de eletrodos.

Nos últimos anos, muitos trabalhos vêm sendo realizados envolvendo a síntese de polímeros por eletropolimerização devido à sua aplicação prática na construção de sensores. Em particular, a modificação da superfície de eletrodos por eletropolimerização de várias fenazinas, fenoxazinas e fenotiazinas foram relatadas na literatura [42,43,47- 49].

1.3.3 Eletropolimerização do Azul de Metileno

O azul de metileno (MB) é um composto aromático heterocíclico, catiônico e sua estrutura química está representada na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura química do monômero azul de metileno.

As propriedades físico-químicas do azul de metileno estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do azul de metileno.

Propriedades	Características
Aparência	sólido verde escuro
Nomenclatura (IUPAC)	3,7- <i>bis</i> (Dimetilamino)-fenazatiônio cloreto trihidratado
Fórmula molecular	$C_{16}H_{18}N_3ClS \cdot 3H_2O$
Peso Molecular	$373,90 \text{ g mol}^{-1}$
Solubilidade em água	$50,0 \text{ g L}^{-1}$ (20°C)
Solubilidade em etanol	$10,0 \text{ g L}^{-1}$ (20°C)
Ponto de Fusão	$100 - 110^\circ\text{C}$

O MB vem sendo amplamente estudado desde sua síntese em 1876. O uso deste corante na modificação de diferentes superfícies eletródicas e como um mediador redox eficaz foi relatado na literatura [41,48,50,51]. Particularmente, como mediador na oxidação de NADH [44,52] (Figura 4) e como um sensor para hemoglobina [53] quando é eletropolimerizado a polímero de azul de metileno (PMB) devido a sua atividade bioeletroquímica.

Figura 4 - Reação de oxidação do NADH

Várias técnicas tais como espectroscópicas [44], eletroquímica [42,43] e eletrogravimétrica [46,54] vêm sendo usadas na investigação do processo de eletropolimerização de MB e moléculas similares.

Barsan e colaboradores [42] estudaram a influência da presença dos ânions NO_3^- ou SO_4^{2-} no processo de eletropolimerização do azul de metileno. Os autores relataram que quando um desses íons está presente na solução de eletrólito suporte o filme polimérico é ainda mais espesso, sugerindo assim que estes ânions catalisam o processo de deposição. Além disso, observaram que apenas na presença do íon nitrato um par redox pode ser observado separadamente no voltamograma cíclico do polímero.

O controle da espessura do filme polimérico pode ser realizado pelo número de ciclos no processo de eletropolimerização. Dessa forma, a espessura pode ser expressa em termos de camadas.

O número de camadas da espécie redox eletroativa pode ser obtido da razão Γ/Γ_{mono} em que Γ representa a área superficial total do polímero sobre o eletrodo base e Γ_{mono} a área superficial ocupada por uma unidade da espécie redox eletroativa. O valor de Γ pode ser obtido a partir da integração da área do pico voltamétrico do polímero, e considerando que dois elétrons estão envolvidos nas reações redox. E o valor de Γ_{mono} equivale a $2,0 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ [55].

A espessura do filme do polímero pode ser calculada a partir da relação $d = v \cdot \Gamma$, onde v e d representam o volume molecular do azul de metileno ($400 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) e a espessura do filme, respectivamente.

De acordo com Karyakin e colaboradores [44] a eletropolimerização de compostos do grupo das azinas ocorre, geralmente, por oxidação anódica do monômero em meio ácido. Entre os polímeros condutores mais comuns eletropolimerizados em meio ácido pode-se destacar a polianilina e o polipirrol [57,58]. No entanto, observaram que no caso do MB a eletropolimerização deveria ser realizada, preferencialmente, em solução aquosa neutra ou básica para a formação de polímeros de azul de metileno. Isto se deve a estrutura do monômero de MB que possui apenas grupos aminos terciários como grupo substituinte dos anéis aromáticos. Dessa forma, o polímero de azul de metileno foi considerado como representante de um novo grupo de polímeros eletroativos. Posteriormente, vários estudos foram realizados no intuito de entender o mecanismo de reação envolvido e a sua estrutura. Neste sentido algumas hipóteses sobre o mecanismo de reação e da estrutura do PMB podem ser encontrados na literatura [44,46,52,53].

Barsan e colaboradores [42] relataram que a reação de polimerização inicia com a adsorção do monômero de MB sobre a superfície do eletrodo de carbono e formação de espécies cátion-radical em potenciais altamente positivos (em torno de 1,0 V) (*vs* SCE). O monômero ao sofrer eletro-oxidação se encontra positivamente carregado. Dessa forma, o único mecanismo provável para o processo de polimerização envolve a formação de espécies cátion-radical seguido por uma reação química para formar o polímero de azul de metileno.

Portanto, na eletropolimerização do azul de metileno deve-se considerar o valor de potencial necessário para ocorrer a formação da espécie eletroativa cátion-radical.

Na reação de eletro-oxidação do monômero ocorre uma transferência de dois elétrons e um próton, como está representado na Figura 5 [52].

Figura 5 - Reação de eletro-oxidação do azul de metileno.

De acordo com Karyakin e colaboradores [44] um mecanismo proposto para a formação do PMB por eletropolimerização é a ligação entre as unidades monoméricas de MB tanto por ligação anel-anel quanto por pontes de grupo amino após ocorrer demetilação. A partir desse estudo propuseram uma estrutura hipotética do polímero de azul de metileno que está representada na Figura 6.

Figura 6 - Estrutura hipotética do polímero de azul de metileno.

Os estudos espectrofotométricos realizados por Schlereth e colaboradores [59] com polímeros de fenotiazinas revelaram que a ligação anel-anel ocorre diretamente por meio das espécies cátion radical.

A cadeia conjugada do PMB consiste de cargas móveis deslocalizadas em uma região de atividade redox de alta condutividade: -0,4 a + 0,5 V.

1.3.4 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com polímero de azul de metileno com ácido ascórbico e L-cisteína.

O ácido ascórbico (AA) é amplamente usado como suplemento na dieta alimentar e como antioxidante para a preservação de alimentos manufaturados. A reação de oxidação de

AA (Figura 7) ocorre segundo um processo eletroquímico no qual o ácido ascórbico é oxidado irreversivelmente a ácido dehidroascórbico.

Figura 7 - Reação de oxidação eletroquímica do ácido ascórbico.

A oxidação de AA em eletrodos metálicos e de carbono ocorre em altos sobrepotenciais. Assim, a oxidação eletroquímica do AA vem sendo utilizada extensivamente como sistema modelo no estudo da atividade eletrocatalítica de EQMs.

A atividade eletrocatalítica do PMB para biomoléculas e diferentes compostos inorgânicos foram relatadas em trabalhos da literatura [45,53,60-62]. O filme do PMB promove a diminuição do sobrepotencial da reação de oxidação eletroquímica da molécula em relação a um eletrodo convencional [58].

Yogeswaran e Chen [63] estudaram a determinação simultânea qualitativa e quantitativa de AA, epinefrina e dopamina com o PMB. O efeito eletrocatalítico, promovido por grupos funcionais do polímero, poderia ser identificado como um aumento na corrente de pico ou pela diminuição do sobrepotencial da reação de oxidação ou redução da espécie de interesse.

A L-cisteína (Figura 8) desempenha um papel importante nos sistemas biológicos e vem sendo amplamente utilizada na medicina e indústrias alimentícias [64]. Dessa forma, é

considerável a necessidade do desenvolvimento de métodos sensíveis para a detecção de L-cisteína nos fluidos corporais, produtos farmacêuticos e amostras de alimentos [65].

Figura 8 – Fórmula estrutural da L-cisteína.

Várias técnicas eletroquímicas e materiais eletródicos foram utilizados para o estudo da oxidação eletroquímica, detecção e determinação de L-cisteína e seus derivados, incluindo a preparação de EQMs [66]. Isto se justifica pela resposta eletroquímica muito pobre e um alto sobrepotencial de oxidação da L-cisteína em eletrodos de carbono convencionais sendo interessante o desenvolvimento de métodos sensíveis para a sua determinação [67].

1.4 Técnicas voltamétricas

A voltametria é uma técnica que consiste na medida das correntes geradas em função de uma dada programação de potenciais imposta a um eletrodo. Os métodos de varredura de potencial consistem na aplicação ao eletrodo de trabalho de um potencial variando

continuamente com o tempo o que conduz à ocorrência de reações de oxidação ou redução de espécies eletroativas na solução [68].

As curvas corrente-potencial, conhecidas por voltamogramas, são obtidas pela variação gradual do potencial aplicado a um eletrodo de trabalho imerso em uma célula eletroquímica contendo a solução de interesse, um eletrodo de referência estável e um eletrodo auxiliar. A forma da perturbação do eletrodo, pela aplicação de diferentes programações de potenciais, define a natureza da técnica voltamétrica [69,70].

1.4.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (do inglês *Cyclic voltammetry* (CV)) é uma das técnicas voltamétricas mais usadas para o estudo de espécies eletroativas em solução ou imobilizadas nos eletrodos, e fornece informações qualitativas sobre sistemas redox. O estudo de mecanismos de reação em solução possibilita detectar intermediários eletroativos tanto para reações relativamente lentas como as rápidas. Além disso, a ocorrência de reações químicas acopladas ao processo do eletrodo, como os processos de imobilização do eletrodo por agentes modificantes pode ser estudada utilizando a técnica de voltametria cíclica [68].

Nesta técnica, se utiliza um eletrodo imerso em uma solução, que é excitado por uma programação de potenciais na forma de uma onda triangular com uma dada velocidade de varredura (constante ou com valores diferentes para cada lado do triângulo). Ao atingir $t = t_1$ a direção de varredura é invertida e variada até $E_{\min}$, e depois invertida e variada para $E_{\max}$, e assim sucessivamente, originando ciclos com diversas varreduras. O intervalo de potenciais de inversão escolhido para um dado experimento é aquele no qual ocorre a oxidação ou a redução controlada por difusão de um ou mais analitos. Uma varredura partindo do potencial

inicial (E_{inicial}) para o potencial final (E_{final}) é chamada varredura direta, e na direção oposta é chamada varredura reversa. Esta forma de variação de potencial é apresentada na Figura 9.

Figura 9 - Potencial aplicado em função do tempo em voltametria cíclica, (E_i : potencial inicial, E_f : potencial final, $E_{\text{máx}}$: potencial máximo, $E_{\text{mín}}$: potencial mínimo). Velocidade de varredura $v = dE/dt$.

Um exemplo de um voltamograma cíclico, ou seja, uma resposta de corrente medida em função do potencial para um sistema reversível é apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Voltamograma cíclico do par redox do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} | [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0, em eletrodo de carbono vítreo. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Os principais parâmetros em um voltamograma cíclico são o potencial de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}), e a corrente de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}). Para uma reação reversível de eletrodo, as correntes de pico anódico e catódico são aproximadamente iguais em valor absoluto, mas de sinais opostos, e a diferença entre os picos de potenciais para um sistema reversível é $0,0592 / n$, onde n é o número de elétrons envolvidos na semi-reação [69,70].

Entre as várias aplicações da técnica de voltametria cíclica, sua utilização nos estudos envolvendo polímeros condutores é de grande importância, fornecendo vários parâmetros relacionados aos estágios de crescimento, na elucidação do mecanismo redox, além de proporcionar um excelente controle sobre a qualidade dos polímeros [44].

Assim, a voltametria cíclica é uma ferramenta para estudos fundamentais e de diagnóstico, que fornece informações qualitativas sobre mecanismos de reações eletroquímicas e identificação de espécies presentes em solução. No entanto, para um estudo quantitativo é necessário empregar técnicas mais sensíveis como, por exemplo, a técnica de voltametria de onda quadrada.

1.4.2 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (do inglês, *Square Wave Voltammetry* (SWV)) é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas. O início do desenvolvimento da SWV se deu em 1953 por Barker, e no decorrer dos anos, apresentou algumas modificações instrumentais aliadas ao desenvolvimento de novas teorias que foram responsáveis pelo

estabelecimento da técnica para a análise de traços e na obtenção de dados relacionados à cinética e ao mecanismo de reações químicas sob as mais variadas condições [71].

A SWV consiste em aplicar pulsos de potenciais de altura “ a ” (amplitude) constante em uma escada de potenciais com largura ΔE_s (incremento de varredura de potenciais) e duração τ (período). As correntes são medidas como uma resultante (ΔI) entre aquelas obtidas na aplicação do pulso no sentido direto (1) ao da escada de potenciais e as correntes dos pulsos no sentido reverso (2) como é apresentado na Figura 11 [71]. O pico voltamétrico resultante apresenta posição, largura e altura características do tipo de sistema redox avaliado.

Figura 11- Forma de aplicação dos pulsos em voltametria de onda quadrada.

A Figura 12 apresenta voltamogramas de onda quadrada típicos de sistemas reversíveis e irreversíveis com as correntes direta, reversa e resultante. A separação das correntes é uma ferramenta muito utilizada para diagnosticar o grau de reversibilidade de um sistema

eletroquímico. Para sistemas reversíveis, quanto maior for a contribuição da corrente reversa maior será a corrente resultante, pois ela é a diferença entre as correntes direta e reversa. Já para sistemas irreversíveis, a corrente reversa é mínima, consequentemente, a sua contribuição para a intensidade da corrente resultante é desprezível [36].

Figura 12 - Voltamogramas esquemáticos de SWV onde: (1) representa um processo redox de sistema reversível e (2) de um sistema irreversível. I_1 – corrente reversa; I_2 – corrente direta; ΔI – corrente resultante ($\Delta I = I_2 - I_1$).

Os parâmetros eletroquímicos, corrente de pico (I_p) e potencial de pico (E_p), fornecem informações importantes quando relacionados com a frequência de aplicação de pulsos de potencial [73]. Para sistemas reversíveis, I_p varia linearmente com a raiz quadrada da frequência, por outro lado, varia linearmente com a frequência para sistemas irreversíveis. Já para sistemas quase-reversíveis, a relação entre I_p e a frequência não é linear.

Dentre as técnicas de pulso, a voltametria de onda quadrada (SWV) é uma das mais modernas, podendo ser usada para investigações analíticas ou cinéticas [74].

1.5 Revisão Bibliográfica

Nesta revisão bibliográfica, serão abordados os estudos sobre a aplicabilidade de polímeros condutores como o polímero de azul de metileno e outras azinas, e suas potencialidades para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos.

Karyakin e colaboradores [52] estudaram a polimerização eletroquímica do MB em soluções aquosas e as propriedades dos filmes resultantes. De acordo com os autores os filmes do PMB possuem atividade redox semelhante à de seus correspondentes monômeros. No voltamograma do polímero observaram um novo par redox, responsável pelas propriedades semicondutoras do polímero. A polimerização em meio alcalino foi considerada pelos autores como condição ideal para a obtenção do filme polimérico. A influência de íons hidróxidos pode ser entendida em termos de catálise nucleofílica, no processo de crescimento do filme polimérico, e por neutralizar a carga positiva da molécula de MB. Dessa forma, um filme espesso do PMB foi obtido e a sua aplicabilidade foi demonstrada na oxidação bioeletroquímica da glicose na presença de glicose oxidase.

Zhou e colaboradores [49] estudaram o desenvolvimento de um eletrodo modificado com um filme de polímero de verde de metileno preparado via polimerização eletroquímica por meio de voltametria cíclica entre -0,4 a +1,2 V (vs SCE) sobre um eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa de verde de metileno. Os autores verificaram que o valor do pH da solução afeta, diretamente, o processo de polimerização e as características do filme, assim como foi relatado nos trabalhos iniciais realizados por Karyakin [52] para o PMB. Quando comparado aos eletrodos modificados obtidos por adsorção de verde de metileno em solução aquosa, o eletrodo modificado com polímero mostrou uma alta estabilidade e uma melhor atividade catalítica para NADH. Os resultados obtidos por estes autores revelaram que uma corrente catalítica pode ser observada para a oxidação de NADH. Além disso, o polímero

poderia diminuir o sobrepotencial de oxidação do NADH por aproximadamente 400 mV. A corrente eletrocatalítica foi proporcional à concentração de NADH com uma boa relação linear de 0,5 a $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação 0,996. Komura e colaboradores [62] desenvolveram um eletrodo modificado com PMB utilizando uma metodologia similar. O polímero apresentou alta condutividade iônica e sua atividade eletrocatalítica foi observada na oxidação da coenzima NADH sendo, portanto, um método aplicável na determinação desta biomolécula.

Karyakin e colaboradores [44] estudaram a eletropolimerização de diferentes azinas em solução aquosa. Os autores relataram a influência da estrutura dos monômeros das azinas no processo de eletropolimerização e nas propriedades dos polímeros formados. Os monômeros das azinas diferenciam pelo segundo heteroátomo e os substituintes dos anéis aromáticos de forma que as poliazinas foram consideradas como um novo grupo de polímeros eletroativos. No intuito de entender o mecanismo de formação das poliazinas estudos eletroquímicos e espectroeletroquímicos foram realizados por estes autores. E a partir da investigação dos mecanismos de reação para a formação do PMB conseguiram propor uma estrutura hipotética para este polímero.

Brett e colaboradores [53] relataram a aplicabilidade de eletrodos modificados com PMB, obtidos via polimerização eletroquímica, na determinação de hemoglobina por eletrooxidação em um potencial fixo usando técnicas de análise por injeção em fluxo. Para o estudo da resposta do filme polimérico, os autores realizaram análises em dois tipos de amostras de sangue, de doadores saudáveis e doentes, que foram injetadas diretamente sobre o eletrodo modificado imerso em eletrólito inerte. Como apenas os resultados obtidos com a amostra de sangue de doadores saudáveis, por injeção eletroquímica, apresentaram boa correlação linear com os obtidos por métodos espectrofotométricos este método foi

considerado um bom método para a detecção de problemas hematológicos. Além disso, obtiveram uma resposta rápida, estável, e reprodutível.

Tan e colaboradores [60] relataram a aplicação do eletrodo modificado com PMB no processo redox da Vitamina B₆ (VB₆) em tampão fosfato (pH 8,0) por meio da técnica de CV. Os autores observaram que a reação do eletrodo para a VB₆ apresenta um comportamento quase-reversível e o processo é governado por transporte de massa controlado por difusão para velocidades de varredura baixas. Uma corrente de pico anódica positiva foi observada na região de potencial de 0,6 V (*vs* SCE) e proporcional a concentração de VB₆ na faixa de 0,010 para 1,03 mg mL⁻¹. O limite de detecção para a VB₆ foi de 1,34 µg mL⁻¹.

Simões e colaboradores [7] realizaram um estudo da interação entre os pesticidas metilparation, paraquat, bentazon, glifosato e os polímeros de condução (polipirrol e polianilina) por meio de métodos ópticos e químicos, a fim de avaliar a sua utilização para a detecção eletroquímica destes pesticidas. Dessa forma, os autores realizaram estudos de adsorção usando espectrofotometria UV-visível e técnicas voltamétricas com eletrodos de pasta de carbono modificados com polímeros. A partir desse estudo, observaram que os agrotóxicos com características ácidas (2,4-D, glifosato e bentazon) eram facilmente adsorvidos ao polímero quando não estava dopado, o que aumentava a resposta voltamétrica do eletrodo de pasta de carbono com PMB. Enquanto que no estudo da interação entre estes pesticidas ácidos e o polipirrol os autores observaram pouca interação, sugerindo que as interações eletrostáticas são dominantes na adsorção de tais pesticidas.

Yogeswaran e colaboradores [63] estudaram a síntese de um filme compósito condutor contendo nanotubos de carbono de paredes múltiplas com PMB sobre eletrodo de carbono vítreo, eletrodos de ouro e de óxido de índio e estanho por métodos potenciométricos. A partir desse estudo os autores relataram que a utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas promove aumento da concentração de PMB no recobrimento superficial (Γ),

aumento da taxa de transferência de elétrons, diminuição da constante de velocidade de transferência de elétron (K_s) de 44,53% e uma diminuição da degradação do polímero de azul de metileno durante as varreduras cíclicas. Dessa forma, o filme compósito foi aplicado na oxidação de ácido ascórbico (AA), dopamina (DA), epinefrina (PE), presentes em solução aquosa pH 7,4, e apresentou uma alta atividade eletrocatalítica para esses compostos. A análise voltamétrica de uma mistura de AA-EP e AA-DA com este filme permitiu a obtenção de picos voltamétricos bem separados de 144 e 164 mV, respectivamente. Os autores concluíram que a presença do PMB no filme compósito aumenta as propriedades funcionais e, geralmente, aumenta a sensibilidade do eletrodo modificado. Os valores de limite de detecção obtidos foram equivalentes com as concentrações encontradas nas condições fisiológicas.

Barsan e colaboradores [42] realizaram um estudo comparativo das propriedades de três diferentes polímeros eletroativos (polímero de azul de metileno, polímero de vermelho neutro e polímero de verde de metileno) imobilizados sobre um eletrodo de carbono. Os autores observaram que a formação de espécies cátion-radical, a partir da oxidação dos monômeros, ocorre em diferentes potenciais. Portanto, as estruturas químicas dos monômeros influenciam o processo de eletropolimerização dos três corantes poliaromáticos. A influência do eletrólito e do pH no crescimento do filme, e as propriedades eletroquímicas também foram investigadas pelos autores nesse trabalho. A caracterização dos eletrodos modificados foi realizada por espectroscopia de impedância eletroquímica. Os autores relataram a possibilidade de uso dos polímeros estudados em biossensores eletroquímicos.

Pauliukaite e colaboradores [43] estudaram a síntese, a caracterização, e aplicações do polímero de vermelho neutro, em particular como mediador redox. Os autores obtiveram resultados que levaram a informações importantes sobre os polímeros de vermelho neutro como a alta condutividade elétrica. As características redox do polímero permitiram aplicações especiais, no desenvolvimento de sensores eletroquímicos e ópticos. Perspectivas

para o uso em biossensores eletroquímicos foram relatadas no trabalho realizado por estes autores.

Pfaffen e colaboradores [46] estudaram o comportamento eletroquímico do PMB em diferentes eletrodos utilizando a microbalança eletroquímica de cristal de quartzo e por medidas espectrofotométricas acopladas a voltametria cíclica. Os resultados eletroquímicos obtidos por estes autores no estudo mostraram que a eletroatividade do polímero depende não apenas do pH mas também do substrato. Os experimentos espectroeletroquímicos mostraram que a eletroatividade do filme depende do equilíbrio radical/cátion- radical.

Hong e colaboradores [45] desenvolveram uma membrana funcional composta de nanopartículas de azul de metileno e Nafion (resina de troca de íon perfluorsulfonatado) que foi imobilizada sobre um eletrodo de carbono vítreo. Os métodos utilizados por estes autores na caracterização da membrana foram microscopia de varredura de elétron, microscopia de transmissão de elétron, UV-vis e espectroscopia na região do infravermelho. Os autores avaliaram a resposta do eletrodo com a enzima peroxidase imobilizada na membrana. O biossensor resultante apresentou uma boa estabilidade e sensibilidade mais alta para o H_2O_2 em relação à membrana sem a enzima peroxidase. A faixa linear obtida com este biossensor para a determinação de H_2O_2 foi de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Neste trabalho, propusemos o uso do polímero de azul de metileno como um mediador redox rápido e sensível na determinação voltamétrica de glifosato. Para nosso conhecimento, não há relatos na literatura envolvendo o estudo eletroquímico com o polímero de azul de metileno para determinação de glifosato.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em preparar e estudar a propriedade eletrocatalítica do polímero de azul de metileno imobilizado sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo para aplicação eletroanalítica. Nesse intuito, os estudos foram conduzidos por meio das técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada para caracterizar o filme polimérico e estudar o comportamento eletroquímico do herbicida glifosato.

Este objetivo geral pode ser detalhado em três itens:

- a) Preparação e caracterização do eletrodo quimicamente modificado com o polímero de azul de metileno imobilizado sobre o eletrodo de carbono vítreo.

Para a obtenção dos filmes do polímero de azul de metileno podem ser aplicadas metodologias distintas, seja por métodos eletroquímicos ou químicos. Os métodos eletroquímicos são interessantes por produzirem filmes com forte aderência à superfície do substrato e com propriedade redox satisfatória. Porém, antes da aplicação eletroanalítica dos filmes do polímero de azul de metileno é preciso compreender de forma clara os processos eletroquímicos que ocorrem durante a formação do filme.

- b) Estudo do comportamento eletrocatalítico do filme do polímero de azul de metileno

De acordo com as condições experimentais propostas neste trabalho foram avaliadas as características eletrocatalíticas do polímero para a oxidação de ácido ascórbico e L-cisteína como moléculas modelo.

- c) Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida glifosato sobre o filme do polímero de azul de metileno.

No intuito de investigar o comportamento eletroquímico do glifosato sobre o filme polimérico foi realizado um estudo, na ausência e na presença deste herbicida, visando à aplicação do eletrodo modificado com o polímero na determinação eletroanalítica do mesmo.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

3.1.1 Célula Eletroquímica

Para medidas eletroquímicas utilizou-se uma célula convencional de vidro Pyrex®, com compartimento único de 30 mL, com tampa de PTFE® contendo orifícios de encaixe para três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo e eletrodo de referência) e um orifício para a saída e entrada de N₂, conforme mostrado na representação esquemática da Figura 13.

Figura 13 - Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada: (1) eletrodo de trabalho, (2) eletrodo de referência, (3) eletrodo auxiliar, (4) entrada de N_2 (5) saída de N_2 .

3.1.2 Eletrodos

3.1.2.1 Eletrodos de referência e auxiliar

O eletrodo de referência utilizado foi o eletrodo Ag/AgCl em uma solução de KCl 3,0 mol L⁻¹. Um fio de prata foi anodizado em uma solução de ácido clorídrico 0,3 mol L⁻¹. O fio de prata contendo o filme de cloreto de prata foi colocado em um tubo de vidro contendo uma solução de KCl 3,0 mol L⁻¹ e cristais de AgNO₃.

O eletrodo auxiliar foi uma placa de platina soldada a um fio de platina de 0,5 mm de diâmetro e embutido em um tubo de vidro, de maneira que não houvesse infiltração de solução.

3.1.2.2 Eletrodo de trabalho

O eletrodo de trabalho foi um eletrodo modificado com polímero de azul de metileno. O eletrodo foi obtido por eletropolimerização de azul de metileno (MB) utilizando a técnica de voltametria cíclica nas condições previamente otimizadas. O eletrodo base utilizado para a imobilização do polímero foi um eletrodo de carbono vítreo (GC) ($A = 0,18 \text{ cm}^2$) embutido em PTFE®.

3.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de pureza analítica (PA). A Tabela 3 apresenta a procedência e a pureza dos reagentes utilizados.

Tabela 3 - Procedência e pureza dos reagentes utilizados.

Reagente	Procedência	Pureza
Glifosato	Milenia Agrociências	97,0%
Hidróxido de sódio	Mallinckrodt	—
Fosfato de sódio dibásico	J. T. Baker	99,6%
Fosfato de sódio monobásico	Mallinckrodt	—
Nitrato de sódio	Sigma-Aldrich	99,0%
Cloreto de potássio	J. T. Baker	99,9%
Azul de metileno	Sigma-Aldrich	90,0%
Ácido Ascórbico	Mallinckrodt	—
L - Cisteína	Cromato Produtos Químicos LTDA	98,5 %
Nitrato de potássio	Merck	99,0%

3.3 Soluções

Todas as soluções foram preparadas em água purificada pelo sistema Barnstead Nanopure.

Uma solução de NaOH na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada para o ajuste do pH das soluções utilizadas.

Soluções de eletrólito suporte foram preparadas a partir das soluções estoque de NaNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,7. As respectivas soluções foram diluídas para um volume final contendo NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,7. Posteriormente, o pH dessa solução foi ajustada para pH 8,0 para a preparação da solução de azul de metileno (MB) e para a limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de carbono vítreo. A solução estoque de MB foi preparada na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0. As demais soluções de MB foram preparadas a partir da diluição dessa solução para $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0.

Soluções estoque de KCl, KNO_3 e NaNO_3 foram preparadas na concentração $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e diluídas para $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para o preparo de soluções de ácido ascórbico na concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Estas soluções foram utilizadas no intuito de estudar a influência de ânions e cátions no processo de transferência de massa utilizando o eletrodo modificado com PMB.

Para a caracterização do filme do PMB foram preparadas soluções de ácido ascórbico $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e L-cisteína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,3). Todas as soluções de ácido ascórbico e L-cisteína foram preparadas momentos antes ao das medidas eletroquímicas.

Uma solução estoque de glifosato na concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para o estudo da sua interação com o PMB. As demais soluções foram preparadas por diluição da solução estoque.

Para o polimento do eletrodo de carbono vítreo utilizou-se uma suspensão de alumina 1 μm , 0,3 μm e 0,05 μm .

3.4 Equipamentos

Para a realização das medidas eletroquímicas foi utilizado um potenciostato da Autolab (PGSTAT 128 N) interfaceado a um computador pelo programa GPES 4.9 acoplado um micro computador adequado.

Os eletrodos de carbono vítreo foram polidos em politriz Panambra Struers modelo DPU-10 a 600 rpm com feltro Buehler®.

3.5 Metodologia

3.5.1 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com polímero de azul de metileno.

As respostas obtidas com os EQMs são dependentes das condições da superfície eletródica. Assim, para a limpeza do eletrodo de carbono vítreo foi realizado um minucioso pré-tratamento eletroquímico e/ou polimento mecânico antes da polimerização eletroquímica. O eletrodo de carbono vítreo foi polido em uma politriz com alumina 1 μm , 0,3 μm e 0,05 μm até se obter um aspecto espelhado da superfície do eletrodo. Em seguida, para remover partículas de alumina, foi submetido à agitação em um ultrasom por 3 minutos em etanol e, em seguida, 2 minutos em purificada. Para assegurar a limpeza da superfície do eletrodo, o

eletrodo foi submetido à aplicação de + 900 mV por 240 s, e ciclado 15 vezes entre -0,4 e 1,0 V a 50 mV s^{-1} em eletrólito suporte, pH = 8,0 [42].

Para a obtenção do filme do polímero de azul de metileno uma solução de azul de metileno $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) foi utilizada. A eletropolimerização foi realizada utilizando a técnica de voltametria cíclica no intervalo de potencial de -0,4 a 1,2 V durante 30 ciclos com velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . Após a síntese do polímero, o eletrodo foi lavado com eletrólito suporte e mantido na geladeira a 4° C por 24 horas [49]. O eletrodo modificado com o filme polimérico é deixado na geladeira também após as medidas eletroquímicas.

A partir da integração da área do pico voltamétrico do polímero foi calculado o valor do recobrimento superficial (Γ) em mol cm^{-2} no intuito de obter informações sobre o filme polimérico imobilizado sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo como a espessura e o número de monocamadas do filme do polímero de azul de metileno [49, 55].

A propriedade eletrocatalítica do filme do polímero de azul de metileno foi verificada para a oxidação de ácido ascórbico e L-cisteína por voltametria cíclica no intervalo de potencial -0,4 a 0,6 V a 50 mV s^{-1} . E, posteriormente, os resultados obtidos com este eletrodo foram comparados com os obtidos em eletrodo de carbono vítreo no intuito de verificar o efeito eletrocatalítico do polímero na análise desses compostos.

Os estudos iniciais com o eletrodo modificado com polímero de azul de metileno para análise de glifosato foram realizados utilizando a técnica de voltametria cíclica. A análise foi realizada num intervalo -0,4 a 0,6 V a 50 mV s^{-1} com uma solução de glifosato $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,3). A resposta voltamétrica apresentou picos anódico e catódico em 0,2 e 0 V respectivamente. A partir desse estudo foi possível verificar a detecção direta de glifosato com o eletrodo desenvolvido.

No intuito obter novas informações sobre o mecanismo de interação do glifosato com o polímero de azul de metileno, estudos posteriores foram realizados utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. Os parâmetros da voltametria de onda quadrada, frequência (f), amplitude (a) e incremento de varredura (ΔE_s) foram estudados para a otimização das condições ideais para a realização das medidas eletroquímicas com glifosato. Para isso foi utilizada uma solução de glifosato $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Voltametria cíclica

O estudo para o desenvolvimento do eletrodo modificado com o polímero de azul de metileno foi realizado por meio da técnica de voltametria cíclica.

Considerando que a espessura do filme polimérico pode ser controlada pelo número de ciclos do processo de eletropolimerização foi realizado o estudo do número de ciclos para o mesmo.

A Figura 14 apresenta os voltamogramas cíclicos da eletropolimerização de azul de metileno $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em eletrodo de carbono vítreo (GC), no intervalo de potencial de -0,4 a 1,2 V e velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . No estudo foi investigado o processo de eletropolimerização durante 30 ciclos (A) e 60 ciclos (B). O eletrólito usado foi uma solução de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ contendo NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0.

Figura 14 – Voltamogramas cíclicos da eletropolimerização de MB em eletrodo de GC **(A)** durante 30 ciclos: (—) 10, (—) 15, (—) 20, (—) 25, (—) 30. **(B)** durante 60 ciclos: (—) 30, (—) 35, (—) 40, (—) 45, (—) 50, (—) 55 e (—) 60. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Na Figura 14 (A) pode ser observado que o processo de eletropolimerização do MB para 30 ciclos apresenta um comportamento eletroquímico quase-reversível. No entanto, para um número maior de ciclos, Figura 14 (B), este comportamento torna-se mais irreversível, além disso, não ocorreu aumento significativo da corrente de pico em relação ao processo realizado com 30 ciclos. Dessa forma, para o desenvolvimento do eletrodo modificado com o polímero de azul de metileno foi realizada a eletropolimerização com um número máximo 30 ciclos voltamétricos.

O estudo envolvendo a relação da espessura do filme com a reversibilidade do processo para poliazinas foi relatada na literatura [59].

A Figura 15 apresenta o perfil do voltamograma cíclico obtido pela eletropolimerização de MB, em eletrodo de GC, no intervalo de potencial de -0,4 a 1,2 V.

Figura 15 - Voltamograma cíclico da eletropolimerização de MB em eletrodo de GC. Solução de MB $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0, 30 ciclos. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Na Figura 15, o voltamograma cíclico do eletrodo modificado com o MB apresenta dois picos redox, em duas regiões de potencial distintas, que podem ser identificados como sendo um referente ao da oxidação do monômero de MB (na região de potencial negativo) e outro referente à formação do polímero (na região de potencial positivo). Esta diferença no comportamento eletroquímico do monômero, em relação ao polímero, ocorre em função da substituição no anel aromático que envolve um sistema com forte atração de elétrons, e provoca um deslocamento do potencial redox do polímero para valores mais positivos (região anódica) em relação ao monômero. No voltamograma cíclico observa-se também um pico na região de potencial em torno de 1,2 V que corresponde à região de formação das espécies cátion-radical.

A aderência do filme polimérico na superfície do eletrodo base pode ser avaliada a partir do valor do recobrimento superficial total do eletrodo de carbono vítreo pelo polímero de azul de metileno (Γ) [63].

O valor de Γ foi obtido a partir do cálculo do valor da carga (Q) envolvida no processo de eletropolimerização de acordo com a relação descrita abaixo:

$$\Gamma = Q / a \quad (1)$$

Onde:

$$Q = A / v \quad (2)$$

$$A = \int i \, dE \quad \text{e} \quad v \text{ a velocidade de varredura}$$

“a” corresponde à área geométrica do eletrodo de carbono vítreo.

O valor da carga envolvida no processo foi obtido a partir da integração da área do pico voltamétrico do polímero de azul de metileno, no intervalo de potencial entre o início e o término do seu processo de formação (- 0,2 a + 0,5 V).

$$Q = 13752 \times 10^{-6} (\text{A}) \times (\text{mV}) / 50 (\text{mV s}^{-1})$$

$$Q = 275 \, \mu\text{C}$$

Posteriormente, o valor da carga foi relacionado com a constante de Faraday, que equivale a aproximadamente 96500 C mol^{-1} . O valor da carga obtido foi equivalente a $2,85 \times 10^{-9} \text{ mol}$. No entanto, na reação de eletro-oxidação do MB estão envolvidos dois elétrons, portanto, o valor da carga envolvida no processo de eletropolimerização corresponde a $1,43 \times 10^{-9} \text{ mol}$.

O cálculo da área geométrica foi realizado de acordo com a equação abaixo:

$$a = \pi r^2 = \pi (0,24 \text{ cm})^2 \quad (3)$$

$$a \approx 0,18 \text{ cm}^2$$

Substituindo os valores de Q e a na equação (1) obteve-se o valor de Γ :

$$\Gamma = 1,43 \times 10^{-9} \text{ mols} / 0,18 \text{ cm}^2$$

$$\Gamma = 7,90 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$$

O valor de Γ obtido no estudo ($7,90 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$) foi próximo a aqueles encontrados em estudos da literatura para filmes de PMB com boa aderência na superfície do eletrodo base.

A partir do valor de Γ foi possível obter informações com relação ao número de camadas das espécies redox eletroativas e a espessura do filme do PMB.

O número de camadas das espécies redox eletroativas do polímero foi obtido pela equação descrita abaixo:

$$\Gamma/\Gamma_{mono} \quad (4)$$

Onde Γ_{mono} corresponde à área superficial ocupada por uma unidade da espécie redox eletroativa que equivale a $2,0 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$.

O valor obtido foi de aproximadamente 39 monocamadas como mostra o cálculo descrito abaixo:

$$\Gamma/\Gamma_{mono} = 7,90 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2} / 2,0 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$$

$$\Gamma/\Gamma_{mono} = 39$$

O valor da espessura do filme pode ser estimado a partir da equação abaixo:

$$d = v \times \Gamma \quad (5)$$

Onde v e d representam o volume molecular do MB e a espessura do filme respectivamente.

Considerando que o volume molecular (v) do MB é $400 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, o valor estimado para a espessura do filme foi de 32 nm como mostra o cálculo descrito abaixo:

$$d = v \times \Gamma = 400 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \times 7,90 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$$

$$d = 32 \text{ nm}$$

O valor da espessura obtida no estudo se encontra dentro da faixa de espessura estimada para o filme utilizando a técnica de microscopia de varredura de elétron que é de 30 a 70 nm [62].

O estudo da influência do pH no comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com o PMB foi realizado uma vez que o potencial redox do MB em solução é fortemente dependente do pH.

A Figura 16 (A) apresenta os voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com PMB em uma solução de eletrólito suporte (tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), para o estudo do comportamento eletroquímico do eletrodo em relação ao pH do meio. A faixa de pH avaliada no estudo foi de 5,6 a 9,0.

Figura 16 – (A) Voltamogramas cíclicos do estudo do eletrodo modificado com PMB em eletrólito suporte, tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para diferentes valores de pH: (—) 5,6, (—) 7,0, (—) 8,0, (—) 9,0. (B) Gráfico da corrente de pico em função do pH. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Na Figura 16 (A), observa-se que o perfil do voltamograma cíclico do polímero muda com o pH do meio. Para valores de pH 8,0 e 9,0, os voltamogramas cíclicos apresentaram

perfis simétricos enquanto que para os valores de pH 7,0 e 5,6 apresentaram perfis assimétricos e com um par redox idêntico ao que aparece no voltamograma de eletropolimerização de MB. Além disso, observa-se um aumento na irreversibilidade da resposta eletroquímica do eletrodo em soluções com maior valor de pH.

A Figura 16 (B) foi construída a partir dos valores de corrente de pico e dos valores de pH do meio. Nesta figura observa-se uma diminuição na corrente de pico com o aumento do pH do meio. Dessa forma, conclui-se que o pH da solução deve ser controlado uma vez que afeta a sensibilidade e a condutividade do PMB nas medidas eletroquímicas.

O estudo com o filme polimérico em meio ácido, em torno de pH 3,0, foi realizado mas não apresentou resposta eletroquímica. Dessa forma, as medidas eletroquímicas com o filme polimérico foram realizadas em soluções com valores de pH igual ou acima de 5,0.

A Figura 17 apresenta voltamogramas cíclicos do estudo da estabilidade do eletrodo modificado com PMB entre -0,4 a 0,5 V (vs Ag/AgCl_(s)) por 100 ciclos consecutivos em eletrólito suporte (tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ e NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹), pH 5,6.

Figura 17 – (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com PMB em eletrólito suporte, tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ e NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹, pH 5,6, por 100 ciclos. (B) Gráfico da corrente de pico em função do número de ciclos. Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.

A Figura 17 (B) foi construída a partir dos valores de corrente de pico e do número de ciclos. Na figura não se observa uma diminuição significativa da corrente de pico com o número de ciclos. Portanto, o filme polimérico apresenta estabilidade para a realização das medidas eletroquímicas que é resultante de uma forte aderência do filme na superfície do eletrodo base.

A Figura 18 apresenta os voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com PMB em eletrólito suporte no estudo da estabilidade do eletrodo durante quatro dias seguidos.

Figura 18 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com PMB em eletrólito suporte, tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, durante quatro dias: (—) 1º, (—) 2º, (—) 3º, (—) 4º. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

A partir dos voltamogramas cíclicos foi observado que há uma diferença significativa na resposta eletroquímica do eletrodo e no perfil voltamétrico entre o primeiro dia, em que o eletrodo foi preparado, e os dias posteriores. No entanto, para o uso do eletrodo nos três dias seguidos ao dia do preparo essa diferença no comportamento eletroquímico do eletrodo não

foi observada. Isto se deve à presença de espécies não adsorvidas à superfície do eletrodo após a eletropolimerização o que pode contribuir para um aumento da resposta de corrente em relação aos demais dias em que foi utilizado.

Dessa forma, o eletrodo modificado com o polímero foi deixado na solução de eletrólito durante 24 horas na geladeira de modo que estas espécies não polimerizadas pudessem ser desorvidas para a solução antes da realização das medidas eletroquímicas.

4.1.1 Caracterização eletroquímica do filme do polímero de azul de metileno com ácido ascórbico e L-cisteína.

O estudo inicial da propriedade eletrocatalítica do eletrodo de carbono vítreo modificado com o polímero de azul de metileno (GCE-PMB) foi realizado utilizando soluções de ácido ascórbico (AA) na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As soluções de KNO_3 , KCl , NaNO_3 foram preparadas na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para o estudo do eletrólito na análise de AA utilizando o GCE-PMB. Os voltamogramas cíclicos do estudo estão representados na Figura 19.

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos do GCE-PMB em diferentes soluções de eletrólito contendo AA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$: (—) GCE-PMB, (—) NaNO_3 , (—) KNO_3 , (—) KCl . Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Na Figura 19, observa-se que o AA em solução de KCl apresenta uma maior corrente de pico em relação a obtida nos outros eletrólitos estudados. Apesar da resposta eletroquímica do AA em solução de NaNO_3 ocorrer em uma região de menor potencial, a corrente de pico obtida neste eletrólito não foi satisfatória. Dessa forma, o KCl foi escolhido como eletrólito para a realização dos estudos posteriores com o GCE-PMB para L-cisteína e glifosato.

A Figura 20 apresenta os voltamogramas cíclicos do GCE-PMB na presença e ausência de AA na concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para avaliar a vantagem do uso do GCE-PMB em relação ao eletrodo de GC. O eletrólito usado foi uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3.

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹: (—) GC com adição de AA 3,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, (—) GCE-PMB, (—) GCE-PMB com adição de AA 3,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.

A eletrooxidação do AA em eletrodo de GC e em GCE-PMB ocorreu aproximadamente em 0,3 V e 0,2 V (*vs* Ag/AgCl_(s)), respectivamente, demonstrando assim a capacidade do polímero de promover a diminuição do sobrepotencial de oxidação de um composto com um alto sobrepotencial de oxidação e o aumento da velocidade de reação.

A reação ocorrida na interface eletrodo-solução pode ser descrita de maneira simplificada como abaixo:

Na interface eletrodo-solução:

No eletrodo:

Onde $GCE-PMB_{ox}$ e $GCE-PMB_{red}$ correspondem às formas oxidadas e reduzidas do polímero de azul de metileno imobilizadas sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo, respectivamente. E DHAA corresponde à forma oxidada do ácido ascórbico (ácido dehidroascórbico).

Além disso, foi observado no estudo com o eletrodo modificado que a oxidação do AA diminui o pH da solução do eletrólito de 5,3 para 3,7. O valor do pK_a do AA é $\approx 4,1$ o que implica que em meio com pH 5,3 ele se encontra, principalmente, na sua forma aniônica. Dessa forma, conclui-se que na reação do AA com o polímero de azul de metileno ocorre uma interação eletrostática entre o ânion ascorbato com os sítios catiônicos do filme polimérico cujo valor de $pK_a \approx 5,6$ [62].

A velocidade de varredura foi variada no intervalo de 10 a 200 $mV s^{-1}$, com o objetivo de avaliar a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo modificado com o polímero de azul de metileno. Na Figura 21 (A) estão apresentados os voltamogramas cíclicos, em diferentes velocidades de varredura, de uma solução de AA na concentração de $1,0 \times 10^{-3} mol L^{-1}$ em solução de KCl $0,1 mol L^{-1}$, pH 5,3.

Figura 21 – (A) Voltamogramas cíclicos do AA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$: Velocidades de varredura: (—) 10, (—) 30, (—) 50, (—) 70, (—) 90, (—) 100, (—) 150, e (—) 200 mV s^{-1} . (B) Gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

A Figura 21 (B) foi construída a partir dos valores de corrente de pico e das velocidades de varredura. Verifica-se que há uma relação linear entre a corrente de pico (I_p) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($r = 0,999$). Este resultado indica que a reação de oxidação do AA utilizando o GCE-PMB é um processo onde a etapa determinante da reação é o transporte de massa para a superfície do eletrodo e que o processo é governado por difusão, uma vez que foi utilizado um eletrólito suporte muito mais concentrado do que a espécie eletroativa – corrente de migração é negligenciável, predominando só a corrente de difusão.

A Figura 22 apresenta os voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo na presença e ausência de uma solução de L-cisteína na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3.

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de GC: (—) em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 5,3; (—) adição de L-cisteína 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.

No voltamograma cíclico observa-se que a oxidação da L-cisteína em eletrodo de carbono vítreo apresenta uma resposta eletroquímica muito pobre e um alto sobrepotencial de oxidação, demonstrando assim a necessidade do uso de eletrodos que permitam a análise desse composto com baixo sobrepotencial de reação e alta sensibilidade.

A Figura 23 apresenta os voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com o polímero de azul de metileno na presença e ausência de L-cisteína na concentração de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 5,3.

Figura 23 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o GCE-PMB: (—) em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 5,3; (—) com adição de L-cisteína 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em solução de eletrólito suporte. Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.

O efeito eletrocatalítico, promovido por grupos funcionais do polímero, pode ser identificado no voltamograma cíclico pelo aumento na corrente de pico, e diminuição do sobrepotencial da reação de oxidação da L-cisteína em relação à resposta obtida com o eletrodo de carbono vítreo.

A velocidade de varredura foi variada no intervalo de 20 a 300 mV s⁻¹, com o objetivo de avaliar a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo. A Figura 24 (A) apresenta os voltamogramas cíclicos, em diferentes velocidades de varredura, de uma solução de L-cisteína na concentração de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 5,3.

Figura 24 – (A) Voltamogramas cíclicos da L-cisteína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidades de varredura: (—) GCE-PMB, (—) 20, (—) 50, (—) 70, (—) 100, (—) 150, (—) 200, (—) 250, (—) 300 mV s^{-1} . (B) Gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

A Figura 24 (B) foi construída a partir dos valores de corrente de pico e das velocidades de varredura. Verifica-se que há uma relação linear entre a corrente de pico (I_p) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($r = 0,999$). Este resultado indica que a reação de oxidação da L-cisteína utilizando o GCE-PMB é um processo onde a etapa determinante da reação é o transporte de massa para a superfície do eletrodo, assim como foi discutido anteriormente para o AA.

4.1.2 Estudo do eletrodo modificado com o polímero de azul de metileno na análise de glifosato

A Figura 25 apresenta os voltamogramas cíclicos para o eletrodo modificado com o polímero de azul de metileno na presença e na ausência de glifosato na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O eletrólito suporte foi uma solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3.

Figura 25 - Voltamogramas cíclicos: (—) de uma solução KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 5,3; (—) de uma solução glifosato 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 5,3. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

No voltamograma verifica-se a presença de correntes de pico anódica e catódica em torno de 0,2 e 0 V (*vs* Ag/AgCl_(s)), respectivamente.

O mecanismo de adsorção de pesticidas ácidos em polímeros condutores foi descrito na literatura relacionado a interações eletrostáticas que aumenta a concentração do pesticida na superfície do eletrodo seguido pelo processo de dopagem [7]. Dessa forma, a resposta voltamétrica do eletrodo modificado com o PMB para o glifosato pode estar relacionada às interações eletrostáticas envolvendo o sítio ativo do polímero.

O pH da solução foi medido antes e depois da medida eletroquímica, e foi observado uma variação no pH do meio. O pH antes e depois da medida era de 5,3 e 3,2, respectivamente. Isto indica que ocorreu a dopagem do polímero de azul de metileno e uma das explicações está relacionada à variação do pH na interface eletrodo-solução.

A relação entre a corrente de pico anódica e catódica ($I_{pa} / I_{pc} = 1$), que para sistemas reversíveis é igual a um, foi constatada na reação de oxidação do glifosato utilizando o eletrodo modificado com polímero de azul de metileno a partir dos valores de corrente de pico anódica e catódica obtidas dos voltamogramas cíclicos do estudo realizado.

A velocidade de varredura foi variada no intervalo de 20 a 300 mV s^{-1} , com o objetivo de avaliar a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo. A Figura 25 (A) apresenta os voltamogramas cíclicos, em diferentes velocidades de varredura, de uma solução de glifosato de concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl 0,1 mol L^{-1} , pH 5,3.

Figura 26 – (A) Voltamogramas cíclicos do glifosato $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl 0,1 mol L^{-1} , pH 5,3. Velocidades de varredura: (—) GCE-PMB (—) 20, (—) 50, (—) 70, (—) 90, (—) 100, (—) 150, (—) 200, (—) 250, (—) 300 mV s^{-1} . (B) Gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

A Figura 26 (B) foi construída a partir dos valores de corrente de pico e das velocidades de varredura. Verifica-se que há uma relação linear entre a corrente de pico, I_p , e a raiz da velocidade de varredura ($r = 0,999$) o que indica a reação de osidação do glifosato utilizando

o GCE-PMB é um processo onde a etapa determinante da reação é o transporte de massa para a superfície do eletrodo, assim como foi discutido para a L-cisteína e o AA. Este comportamento é esperado em função do tipo de difusão linear semi-infinita que ocorre em eletrodos convencionais, como o utilizado neste trabalho, onde a concentração de espécies eletrativas decai com o tempo, como previsto nas Leis de Fick.

4.2 Voltametria de onda quadrada

Estudos por SWV foram realizados para o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação de glifosato.

Os estudos por SWV foram realizados utilizando uma solução de glifosato na concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada a partir de uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3. A separação da corrente resultante nas suas componentes direta e reversa, apresentada na Figura 27, foi verificada no estudo voltamétrico da oxidação de glifosato.

Figura 27 - Voltamograma de onda quadrada de uma solução de glifosato $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3. Frequência 100 s^{-1} , amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Componentes da corrente: (—) corrente resultante, (—) corrente reversa e (—) corrente direta.

O valor da corrente resultante na SWV é a diferença entre os valores de corrente direta e corrente reversa [71]. Observando a Figura 27, pode-se concluir que a reação redox do glifosato com o GCE-PMB apresenta comportamento de um sistema reversível.

Os parâmetros da voltametria de onda quadrada, frequência (f), amplitude (a) e incremento de varredura (ΔE_s) foram estudados para a otimização das condições ideais para a realização das medidas eletroquímicas com glifosato. Para isso foi utilizada uma solução de glifosato $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3.

4.2.1 Estudo da variação de frequência de pulsos

A frequência da SWV é uma das mais importantes variáveis, pois, mantendo-se constante a concentração, é a frequência que determina a intensidade dos sinais, e

consequentemente, a sensibilidade do método. Quando se realiza uma variação de frequência em uma dada análise, faz-se uma variação na velocidade com que a varredura de potencial é realizada.

A Figura 28 apresenta os voltamogramas da onda quadrada obtidos para glifosato em função da variação da frequência.

Figura 28 - (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato em solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3. Amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Valores de frequência: (—) 10, (—) 20, (—) 30, (—) 40, (—) 50, (—) 60, (—) 70, (—) 80, (—) 90 e (—) 100 s^{-1} **(B)** Gráfico de corrente de pico em função da raiz da frequência de pulsos aplicada.

Observando a Figura 28 (A), nota-se que a intensidade de corrente de pico aumenta com a frequência o que confere, dessa forma, maior sensibilidade à medida eletroquímica. Desta forma, a frequência de 100 s^{-1} foi escolhida para análises posteriores do filme do GCE-PMB com glifosato.

Para estudar o comportamento da I_p em função da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais, foi construído um gráfico que está apresentado na Figura 28 (B). No estudo, foi observada uma relação linear entre a corrente de pico e a raiz quadrada da

frequência ($r = 0,999$) o que mostra que a reação redox do GCE-PMB com glifosato envolve um sistema reversível [71].

4.2.2 Estudo da variação da amplitude de pulsos

Para os estudos de amplitude, os valores de frequência e de incremento de varredura foram mantidos com os valores de 100 s^{-1} e 2 mV , respectivamente. A variação de amplitude foi realizada no intervalo de 10 a 100 mV . A Figura 29 (A) apresenta os voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo modificado com o PMB em uma solução de glifosato $5,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$.

Figura 29 - (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de $5,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de glifosato em solução KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3. Frequência 100, incremento de varredura 2 mV . Valores de amplitude: (—) 10, (—) 20, (—) 30, (—) 40, (—) 50, (—) 60, (—) 70, (—) 80, (—) 90 e (—) 100 mV. **(B)** Gráfico de corrente de pico em função da amplitude de pulsos.

A partir dos valores das correntes de pico (I_p) dos voltamogramas da figura acima, foi construído um gráfico que relaciona I_p com a amplitude. Este gráfico está apresentado na Figura 29 (B). O aumento da I_p foi linear com o aumento da amplitude nos valores de 10 a 100 mV, além disso, não houve distorção dos voltamogramas. No entanto, para reações reversíveis com adsorção de produtos e reagentes, a corrente de pico aumenta proporcionalmente somente para valores de amplitude menores que 60 mV. Dessa forma, optou-se pelo valor de amplitude 50 mV para as medidas eletroquímicas com o eletrodo modificado na análise de glifosato.

4.2.3 Estudo da variação de incremento de varredura

O incremento de varredura é importante, pois, juntamente com a frequência, ele determina a velocidade efetiva da SWV [71]. Com o aumento do incremento de varredura, deve ocorrer uma maior intensidade na corrente de pico, conseqüentemente, uma melhora na sensibilidade do método.

A Figura 30 (A) apresenta os voltamogramas do estudo da variação do incremento de varredura para o glifosato.

Figura 30 - (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato em solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3. Frequência 100, amplitude 50 mV. Valores de incremento de varredura: (—) 2, (—) 4, (—) 6, (—) 8, (—) 10. **(B)** Dependência da intensidade da corrente de pico com a amplitude.

A Figura 30 (A) mostra a dependência do potencial e da intensidade da corrente de pico em função da variação do incremento de varredura. No estudo realizado não foi observado um aumento significativo nas intensidades das correntes de pico com o aumento do incremento de varredura. Isto pode estar relacionado à velocidade do processo de transferência de elétrons envolvida na oxidação do glifosato pelo filme do GCE-PMB. Assim, optou-se por trabalhar com o valor $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ para a determinação do glifosato com o GCE-PMB. A partir dos valores das correntes de pico (I_p) dos voltamogramas de onda quadrada foi construído um gráfico que relaciona I_p com o incremento cujo gráfico está apresentado na Figura 30 (B). Nessa figura observa-se que o aumento no valor do incremento de varredura não ocasiona aumento significativo no valor da I_p .

A Tabela 4 apresenta os parâmetros da voltametria de onda quadrada, considerando a frequência de pulsos, a amplitude de pulsos, o incremento de varredura, o intervalo de variação estudado e os valores otimizados.

Tabela 4 - Parâmetros da voltametria de onda quadrada avaliados, intervalos de estudo e valores escolhidos.

Parâmetro	Intervalo de estudo	Valor otimizado
Frequência	10 - 100 s ⁻¹	100 s ⁻¹
Amplitude	10 - 100 mV	50 mV
Incremento de varredura	2 - 10 mV	2 mV

Após a otimização dos parâmetros experimentais, um estudo preliminar utilizando uma amostra sintética de glifosato foi realizado com a concentração variando de $2,96 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $4,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, partindo-se de uma solução estoque na concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 31 apresenta os voltamogramas de onda quadrada registrados no intervalo de concentração estudado.

Figura 31 - Voltamograma de onda quadrada de uma solução de glifosato em solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3. Frequência 100 s^{-1} , amplitude 50 mV e incremento de varredura 2 mV. Valores de concentração em mol L^{-1} : (—) GCE-PMB; (—) $2,96 \times 10^{-5}$, (—) $5,92 \times 10^{-5}$, (—) $8,88 \times 10^{-5}$, (—) $1,18 \times 10^{-4}$, (—) $2,96 \times 10^{-4}$, (—) $4,14 \times 10^{-4}$.

Na Figura 31, pode-se observar que é possível realizar a detecção eletroquímica direta do glifosato por SWV para concentrações a partir de $2,96 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O estudo mostra também que ocorre uma diminuição da resposta da corrente de pico, entre as medidas eletroquímicas, que pode estar relacionado a mecanismos complexos envolvendo a interação do polímero de azul de metileno com o glifosato. No entanto, ainda não se tem relatos na literatura envolvendo uma investigação da interação do eletrodo modificado com o polímero para o glifosato, sendo necessário, portanto, que novos estudos sejam realizados nesse intuito.

5. Conclusões

O eletrodo modificado com o filme do PMB foi desenvolvido a partir de um método simples de preparo, a eletropolimerização, por meio da técnica de voltametria cíclica. O GCE-PMB apresentou características favoráveis para aplicação eletroanalítica, como forte aderência à superfície do eletrodo de carbono vítreo (eletrodo base) e estabilidade ao longo das medidas eletroquímicas.

O estudo com o GCE-PMB apresentou aumento na sensibilidade da resposta de corrente de pico e menor sobrepotencial quando comparado ao estudo com eletrodo de GC para o ácido ascórbico e a L-cisteína. Dessa forma, o GCE-PMB pode ser utilizado como um sensor para a determinação de espécies com alto sobrepotencial de reação em eletrodos convencionais.

Estudos de CV mostraram o potencial do GCE-PMB na detecção eletroquímica direta do glifosato para concentrações a partir de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O estudo da variação da velocidade de varredura mostrou uma relação linear entre a raiz quadrada da velocidade de varredura e a corrente de pico, indicando que o processo envolvido na reação redox do GCE-

PMB com o glifosato é controlado por difusão e a etapa determinante da reação é a transferência de massa para superfície do eletrodo.

No estudo por SWV, a relação linear entre a raiz quadrada da frequência de pulso e a corrente de pico indicou que a reação redox do glifosato com o GCE-PMB envolve um processo reversível.

A detecção eletroquímica direta do glifosato por SWV com o filme polimérico pode ser obtida para concentrações a partir de $2,96 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Portanto, torna-se interessante que novos estudos sejam realizados para entender os mecanismos de reação envolvendo o polímero e o glifosato para posterior aplicação na análise de amostras reais deste herbicida, uma vez que o eletrodo desenvolvido demonstrou grande potencial na detecção eletroquímica direta de glifosato sem a necessidade do uso de agentes complexantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SOUZA, M. F.B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997.
2. BERTOTTI, M.; LOWINSOHN, D. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, 2006.
3. LANGE, U.; ROZNYATOVSKAYA, N. V.; MIRSKY, V. M. Conducting polymers in chemical sensors and arrays. **Analytica Chimica Acta**, v. 614, n. 1, p. 1-26, 2008.
4. KANATZIDIS, M. G. Conductive polymers. **Chemical & Engineering News**, v. 68, n. 49, p. 36-54, 1990.
5. MACDIARMID, A. G.; ZHENG, W. Electrochemistry of conjugated polymers and electrochemical applications. **Materials Research Society Bulletin**, v. 22, n. 6, p. 24-30, 1997.
6. PRON, A.; RONNOU, P. Processible conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and superconductors. **Progress in Polymers Science**, v. 27, n. 1, p. 135-190, 2002.
7. SIMÕES, F. R.; MATTOSO, L. H. C.; VAZ, C. M. P. Conducting polymers as sensor materials for the electrochemical detection of pesticides. **Sensor Letters**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2006.
8. STEPHENSON, G. R.; FERRIS, I. G.; HOLLAND, P. T.; NORDBERG, M. Glossary of terms relating to pesticides. **International Union of Pure and Applied Chemistry. Chemistry and the Environment Division**, p. 1-72, 2005.
9. AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 420-428, 2002.
10. TADEO, J. L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; PÉREZ, R. A.; FERNÁNDEZ, M. D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 882, n. 1-2, p. 175-191, 2000.
11. AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

12. DANIELE, P. G.; STEFANO, C.; PRENESTI, E.; SAMMARTANO, S. Copper(II) complexes of N-(phosphonomethyl) glycine in aqueous solution: a thermodynamic and spectrophotometric study. **Talanta**, v. 45, n. 2, p. 425-431, 1997.
13. TOMLIN, C. (Ed.). **The pesticide manual: a world compendium**. 10. ed. Surrey: Crop protection publications, 1994. 1341 p.
14. CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do Estado do RS. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1982-1986, 2008.
15. SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. **Weed Science**, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1975.
16. BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. **Trace Determination of pesticides and their degradation products in water**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 2003. p. 18 - 40.
17. GLASS, R. L. Metal complex formation by glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 1249-1253, 1984.
18. HOAGLAND, R. E.; DUKE, S. O. **Biochemical effects of glyphosate**. Washington: ACS, 1982. 48 p. (ACS Symposium Series, 181).
19. COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; DO AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.
20. RIOS, C., SALVADO, V., HIDALGO M. Facilitated transport and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA through a solid supported liquid-membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 203, n. 1-2, p. 201-208, 2002.
21. COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 2005.
22. HIDALGO, C.; RIOS, C.; HIDALGO, M.; SALVADO, V.; SANCHO, J. V.; HERNANDEZ, F. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1035, n. 1, p. 153-157, 2004.
23. GOODWIN, L.; STARTIN, J. R.; KEELY, B. J.; GOODALL, D. M. Analysis of glyphosate and glufosinate by capillary electrophoresis-mass spectrometry utilising a sheathless microelectrospray interface. **Journal of Chromatography A**, v. 1004, n. 1-2, p. 107-119, 2003.
24. MOROVJÁN, G.; FEKETE, J.; RÉPÁSI, J. Determination of glyphosate and some related compounds by ion-exchange high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 18, n. 16, p. 3219-3232, 1995.

25. JIANG, J.; LUCY, C. A. Determination of glyphosate using off-line ion exchange preconcentration and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection. **Talanta**, v. 72, n. 1, p. 113-118, 2007.
26. CHIU, H-Y.; LIN, Z-Y.; TU, H-L.; WHANG, C-W. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, n. 1, p. 195-198, 2008.
27. CORBERA, M.; HIDALGO, M.; SALVADO, V.; WIECZOREK, P. P. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in natural water using the capillary electrophoresis combined with enrichment step. **Analytica Chimica Acta**, v. 540, n. 1, p. 3-7, 2005.
28. CHANG, S. Y.; LIAO, C-H. Analysis of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with indirect fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 959, n. 1-2, p. 309-315, 2002.
29. LAWRENCE, N.S.; BECKETT, E. L.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Advances in the voltammetric analysis of small biologically relevant compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 303, n. 1, p. 1-16, 2002.
30. FRIESTAD, H. O.; BROENSTAD, J. O. Improved polarographic method for determination of glyphosate herbicide in crops, soil and water. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 76-79, 1985.
31. FRIESTAD, H. O.; BROENSTAD, J. O. Method for determination of glyphosate residues in natural waters based on polarography of the N-nitroso derivative. **Analyst**, v. 101, n. 1207, p. 820-824, 1976.
32. TEÓFILO, R. F.; REIS, E. L.; REIS, C.; SILVA, G., A.; KUBOTA, L. T. Experimental design employed to square wave voltammetry response optimization for the glyphosate determination. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 865-871, 2004.
33. SUBRAMANIAM, V. AND HOGGARD, P. E., Metal complexes of Glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1326-1329, 1988.
34. COUTINHO, Cláudia Flávia Breda. **Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação do herbicida glifosato**. 2008. 116 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
35. MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R.W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.
36. KATZ, E.; LOTZBEYER, T.; SCHLERETH, D. D.; SCHUHMANN, W.; SCHMIDT, H-L. Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes at gold and platinum electrode surfaces modified with a monolayer of pyrroloquinoline quinone. Effect of Ca^{2+} cations. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 189-200, 1994.

37. PERSSON, B. A chemically modified graphite electrode for electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide based on a phenothine derivative, 3- β -naphthoyl-toluidine blue O. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 61-80, 1990.
38. PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1013, 2002.
39. KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. (Ed.) **Laboratory techniques in electroanalytical chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. 986 p.
40. VENDRAME, ZILDA BARATTO. **Eletrodos modificados e não modificados na determinação de compostos sulfurados - um estudo comparativo**. 2004. 159 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Santa Maria, 2004
41. ZARBIN, A. J. G.; DE PAOLI, M-A.; ALVES, O. L. Nanocomposites glass/conductive polymers. **Synthetic Metals**, v. 99, n. 3, p. 227-235, 1999.
42. BARSAN, M. M.; PINTO, E. M.; BRETT, C. M. A.; Electrosynthesis and electrochemical characterisation of phenazine polymers for application in biosensors. **Electrochimica Acta** , v. 53, n. 11, p. 3973-3982, 2008.
43. PAULIUKAITE, R.; BRETT, C. M. A.; Poly(neutral red): Electrosynthesis, characterization, and application as a redox mediator. **Electroanalysis**, v. 20, n. 12, p. 1275-1285, 2008.
44. KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E.; SCHIMIDT, H. L. Electropolymerized azines: a new group of electroactive polymers. **Electroanalysis**, v. 11, n. 3, p. 149-154, 1999.
45. HONG, J.; GHOURCHIANA, H.; REZAEI-ZARCHIA, S.; MOOSAVI-MOVAHEDIA, A. A.; AHMADIANA, S.; SABOURYA, A. A. Nafion-methylene blue functional membrane and its application in chemical and biosensing. **Analytical Letters**, v. 40, n. 3, p. 483-496, 2007.
46. PFAFFEN, V.; ORTIZ, P. I.; DE TORRESI, S. I. CÓRDOBA; TORRESI, R. M. On the pH dependence of electroactivity of poly(methylene blue) films. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 5, p. 1766-1777, 2010.
47. PUSKA'Š, Z.; INZELT, G. Formation and redox transformations of polyphenazine. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 7-8, p. 1481-1490, 2005.
48. ARGÜELLO, J.; LEIDENS, V.L.; MAGOSSO, H.A.; RAMOS, R.R.; GUSHIKEM, Y. Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by methylene blue adsorbed on a phosphorylated zirconia-silica composite electrode. **Electrochimica Acta**. v. 54, n. 2, p. 560-565, 2008.
49. ZHOU, D-M.; FANG, H-Q.; CHEN, H-Y.; JU, H-X.; WANG, Y. The electrochemical polymerization of methylene green and its electrocatalysis for the oxidation of NADH. **Analytica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 41-48, 1996.

50. ARVAND, M.; SOHRABNEZHAD, SH.; MOUSAVI, M.F. ; SHAMSIPUR, M.; ZANJANCHI, M.A. Electrochemical study of methylene blue incorporated into mordenite type zeolite and its application for amperometric determination of ascorbic acid in real samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 491, n. 2, p. 193–201, 2003.
51. DILGIN, Y.; DURSUN, Z.; NISLI, G.; GORTON, LO. Photoelectrochemical investigation of methylene blue immobilised on zirconium phosphate modified carbon paste electrode in flow injection system. **Analytica Chimica Acta**, v. 542, n. 2, p. 162-168, 2005.
52. KARYAKIN, A. A.; STRAKHOVA, A. K.; KARYAKINA, E. E.; VARFOLOMEYEV, S. D.; YATSIMIRSKY, A. K. The electrochemical polymerization of methylene blue and bioelectrochemical activity of the resulting film. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 32, n. 2, p. 35-42, 1993.
53. BRETT, C. M. A.; INZELT, G.; KERTESZ, V. Poly(methylene blue) modified electrode sensor for haemoglobin. **Analytica Chimica Acta**, v. 385, n. 1-3, p. 119-123, 1999.
54. KERTBSZ, V.; BACSKAI, J.; AND INZELT, G. Monitoring of formation and redox transformations of poly(methylene blue) films using an electrochemical quartz crystal microbalance. **Electrochimica Acta**, v. 41, n. 18, p. 2877-2881, 1996.
55. SVETLICIC, VESNA; CLAVILIER, JEAN; ZUTIC, VERA; CHEVALET, JEAN. Electrochemical evidence of two-dimensional surface compounds of heterocyclic molecules at sulphur-covered gold and platinum. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 312, n. 1-2, p. 205-218, 1991.
56. OCHMANSKA, J.; PICKUP, PG. Conducting polypyrrole films containing $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipyridine})_2(3\text{-}\{\text{pyrrol-1-ylmethyl}\}\text{pyridine})\text{Cl}]^+$: Electrochemistry, spectroelectrochemistry, electronic conductivity, and ionic conductivity. **Journal of electroanalytical chemistry**, v. 271, n. 1-2, p. 83-105, 1989.
57. MACDIARMID, A.G.; CHIANG, J.C.; RICHTER, A.G.; EPSTEIN, A. Polyaniline: A new concept in conducting polymers, **Synthetic Metals**, v. 18, n. 1-3, p. 285–290, 1987.
58. LI, Y.; QIAN, R. Effect of anion and solution pH on the electrochemical behavior of polypyrrole in aqueous solution, **Synthetic Metals**, v. 28, n. 1-2, p. 127–132, 1989.
59. SCHLERETH, D. D.; KARYAKIN, A. A. Electropolymerization of phenothiazine, phenoxazine and phenazine derivatives: characterization of the polymers by UV-visible difference spectroelectrochemistry and Fourier transform IR spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 395, n. 1-2, p. 221-232, 1995.
60. TAN, L.; XIE, Q.; YAO, S. Electrochemical and spectroelectrochemical studies on pyridoxine hydrochloride using a poly(methylene blue) modified electrode. **Electroanalysis**, v. 16, n. 19, p. 1592–1597, 2004.
61. SILBER, A.; HAMPP, N.; SCHUHMANN, W. Poly(methylene blue)-modified thick-film gold electrodes for the electrocatalytic oxidation of NADH and their application in glucose biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 11, n. 3, p. 215–223, 1996.

62. KOMURA, T.; NIU, G. Y.; YAMAGUCHI, T.; ASANO, M.; MATSUDA, A. Coupled electron-proton transport in electropolymerized methylene blue and the influences of its protonation level on the rate of electron exchange with b-Nicotinamide Adenine Dinucleotide. **Electroanalysis**, v. 16, n. 21, p. 1791-1800, 2004.
63. YOGESWARAN, U.; CHEN, S-M. Multi-walled carbon nanotubes with poly(methylene blue) composite film for the enhancement and separation of electroanalytical responses of catecholamine and ascorbic acid. **Sensors and Actuators B**, v. 130, n. 2, p.739–749, 2008.
64. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L.T. An amperometric sensor based on electrochemically triggered reaction: Redox-active Ar–NO/Ar–NHOH from 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the low voltage cysteine detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 612, n. 1, p. 87-96, 2008.
65. MALEKI, N.; SAFAVI, A.; SEDAGHATI, F.; TAJABADI, F. Efficient electrocatalysis of l-cysteine oxidation at carbon ionic liquid electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 369, n. 2, p. 149-153, 2007.
66. VANDEBERG, P.J.; JOHNSON, D.C. Pulsed electrochemical detection of cysteine, cystine, methionine, and glutathione at gold electrodes following their separation by liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 65, n. 20, p. 2713-2718, 1993.
67. MIMICA, D.; BEDIOUI, F.; ZAGAL, J. H. Reversibility of the L-cysteine/L-cystine redox process at physiological pH on graphite electrodes modified with coenzyme B₁₂ and vitamin B₁₂. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 4, p. 323-329, 2002.
68. VAZ, CARLOS MANOEL PEDRO. **Metodologia eletroanalítica para medida de atrazina em águas e solução de solos**. 1994. 97 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
69. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**, 5. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1998. 917 p.
70. BRETT, A.M.O.; BRETT, C.M.A. **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Oxford University Press, 1993. 463 p.
71. SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.
72. RAMALEY, L.; KRAUSE, M.S.; Theory of square wave voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1362-1369, 1969.
73. LOVRIC, M. Square wave voltammetry of an adsorbed reactant. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 248, n. 2, p. 239-253, 1988.
74. ZACHOWSKI, E. J.; WOJCIECHOWSKI, M.; OSTERYOUNG, J. The analytical application of square-wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 183, p. 47-57, 1986.