

**UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

Instituto de Química

Campus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS  
QUANTITATIVOS E DE SISTEMAS DE *SCREENING*  
PARA A DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO**

Aline Santana da Silva

Tese de Doutorado

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Redigolo Pezza

Orientadora

Prof. Dr. Leonardo Pezza

Coorientador

Araraquara - SP

2012

**Aline Santana da Silva**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS  
QUANTITATIVOS E DE SISTEMAS DE *SCREENING*  
PARA A DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO**

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Química.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Redigolo Pezza (Orientadora)

Prof. Dr. Leonardo Pezza (Coorientador)

Araraquara

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

S586d Silva, Aline Santana da  
Desenvolvimento de métodos quantitativos e de sistemas de *screening* para a determinação de glifosato / Aline Santana da Silva. – Araraquara : [s.n], 2012  
208 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Helena Redigolo Pezza

Coorientador: Leonardo Pezza

1. Química analítica. 2. Espectroscopia de reflectância

difusa. 3. Espectrofotometria. I. Título.

ALINE SANTANA DA SILVA

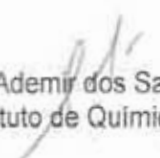
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 28 de fevereiro de 2012.


BANCA EXAMINADORA



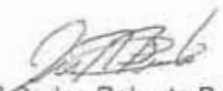
Profª Drª Helena Redigolo Pezza (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Dr. Ademir dos Santos  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Matthieu Tubino  
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas



Profª Drª Carlos Roberto Bellato  
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas – UFV, Viçosa



Profª Drª Graziella Ciaramella Moita  
Centro de Ciências da Natureza – UFPI, Teresina

# ***DADOS CURRICULARES***

## **1. Formação acadêmica**

### 1.1 Graduação

Química – Bacharel, Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Período: 2000 a 2004

### 1.2 Pós-Graduação

Mestrado em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina.

Período: 2005 a 2007

## **2. Doutorado-Sanduiche**

- 2.1 Estágio de doutorado no exterior, realizado no período de junho a novembro de 2010, no Grupo de Análises Bioquímicas, Ambientais e Industriais (GABAI) do Departamento de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal.

## **3. Artigos aceitos ou publicados**

- 3.1 SILVA, A. S.; FERNANDES, F. C. B.; TOGNOLLI, J. O.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A simple and Green analytical method for determination of glyphosate in commercial formulations and water by diffuse reflectance spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 5, p. 1881-1885, 2011.
- 3.2 SILVA, A. S.; TÓTH, I. V.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R.; LIMA, J. L. F. C. Determination of glyphosate in water samples by multi-pumping flow system coupled to a liquid waveguide capillary cell. **Analytical Science**, v. 27, n. 10, p. 1031-1036, 2011.

- 3.3 SILVA, A. S.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de glifosato em formulações comerciais de herbicidas. **Química Nova**, v. 35, p. 114-118, 2012 .

#### **4. Trabalhos apresentados e participação em eventos científicos**

- 4.1 III Seminário sobre contaminantes em alimentos, promovido pelo Instituto de Tecnologia em Alimentos, realizado de 13 a 14 de Novembro de 2008, Campinas (SP).
- 4.2 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, promovido pela Sociedade Brasileira de Química, realizado de 18 a 21 de outubro de 2009, Salvador (Bahia), com apresentação em pôster do trabalho intitulado “**Aplicação da espectroscopia de reflectância difusa na determinação dos teores de glifosato em amostras de água**”. Autores: Aline Santana Silva, Leonardo Pezza e Helena Redigolo Pezza.
- 4.3 XVI Encontro Luso-Galego de Química, promovido pela Sociedade Portuguesa de Química e Associação dos Químicos da Galícia, realizado de 10 a 12 de Novembro de 2010, na Universidade de Aveiro, Aveiro (Portugal), com comunicação oral do trabalho intitulado “**Método alternativo para a determinação direta de glifosato baseado em sistema em fluxo com multi-bombas**”. Autores: Aline Santana Silva, Ildokó V. Tóth, Leonardo Pezza, Helena Redigolo Pezza e José L. F. C. Lima.
- 4.4 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, promovido pela Sociedade Brasileira de Química, realizado de 23 a 26 de maio de 2011, Florianópolis (SC), com apresentação em pôster do trabalho intitulado “**Determinação direta de glifosato em formulações comerciais por injeção em fluxo**”. Autores: Aline S. Silva, Leonardo Pezza e Helena R. Pezza.

- 4.5 III Simpósio Internacional sobre Glyphosate: Uso Sustentável, promovido pela Faculdade de Ciências Agronômicas (UNESP), realizado de 30 de maio a 2 de junho de 2011, Botucatu (SP), com apresentação em pôster e oral do trabalho intitulado **“Desenvolvimento de métodos analíticos limpos para a determinação direta de glifosato em águas**. Autores: Aline S. Silva, Ildikó V. Tóth, José L. F. Costa Lima, Leonardo Pezza e Helena R. Pezza
- 4.6 Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXVII, promovido pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, realizado de 28 de agosto a 2 de setembro de 2011, Búzios (RJ), com apresentação em pôster do trabalho intitulado **“Flow injection analysis system for screening and determination of sulfonamides in drinking water samples”**. Autores: Flávio C. Bedatty, Aline S. Silva, Helena R. Pezza e Leonardo Pezza.
- 4.7 Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXVII, promovido pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, realizado de 28 de agosto a 2 de setembro de 2011, Búzios (RJ), com apresentação oral do trabalho intitulado **“Development and validation of a method for the analysis of glyphosate by multi-pumping flow system”**. Autores: Aline S. Silva, Ildikó V. Tóth, José L. F. Costa Lima, Leonardo Pezza e Helena R. Pezza.
- 4.8 16º Encontro Nacional de Química Analítica, promovido pela Sociedade Brasileira de Química, realizado de 23 a 26 de outubro de 2011, Campos do Jordão (SP), com apresentação em pôster do trabalho intitulado **“Desenvolvimento de método reflectrométrico para a determinação de ácido *p*-aminobenzóico em fármacos”**. Autores: Carla B. Rosati, Aline Santana Silva, Helena R. Pezza e Leonardo Pezza.

- 4.9 16° Encontro Nacional de Química Analítica, promovido pela Sociedade Brasileira de Química, realizado de 23 a 26 de outubro de 2011, Campos do Jordão (SP), com apresentação em pôster do trabalho intitulado “**Desenvolvimento de método espectrofotométrico em fluxo para a determinação de sulfaquinoxalina sódica em amostras de medicamentos veterinários**”. Autores: Tiago A. Catelani, Aline Santana Silva, Helena R. Pezza e Leonardo Pezza.

## **5. Outras informações**

- 5.1 Supervisão científica do trabalho de iniciação científica da aluna **Carla Baricala Rosati** (bolsista CNPq) de fevereiro a julho de 2011, intitulado: Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de ácido *p*-aminobenzoico em formulações farmacêuticas e matrizes biológicas.
- 5.2 Supervisão científica do trabalho de iniciação científica da aluna **Nathália Castro** (bolsista CNPq) de agosto a janeiro 2012, intitulado: Desenvolvimento de método analítico para a determinação de nitrito em matrizes diversas.



*Aos meus pais, Geraldo Machado e Maria Iracema,  
Parceiros de luta e esperança*

*Às minhas irmãs e sobrinhos (as),  
Sempre presentes em minha vida*

*Ofereço*

*Aos meus tios e incentivadores,*

*José Machado e Rita Maria*

*Aos mestres e amigos,*

*Sebastião Barros e José L. F. C. Lima*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por mais um desafio conquistado;

Ao Programa de Pós-graduação em Química e seus Professores, pela oportunidade.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Redigolo Pezza, pela confiança depositada, orientação e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Pezza, pela coorientação e sugestões fornecidas.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mercedes de Moraes e ao Prof. João O. Tognolli, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. José L F. Costa Lima pela oportunidade de realização de parte deste estudo com o grupo GABAI.

A Dr<sup>a</sup>. Ildikó Tóth, pela parceria e valiosas sugestões no desenvolvimento deste estudo.

Ao REQUIMTE da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pelo apoio técnico.

A Sandra Soares, pelo carinho e amizade.

Ao grupo GABAI, em especial aos pesquisadores João Santos, João Prior, Marcela Segundo e João Lopes, e aos colegas de laboratório Vera Lúcia Abreu, David Ribeiro, Christian Frigerio, Nestor Aracama, Fellipa Ribeiro, Patrícia Monteiro, Manuela Silva, Mariano Cristaldi, pelo apoio e troca de informações.

Aos colegas do grupo LATIG Prof. Dr. Massao Ionashiro e aos alunos de pós-graduação Cláudio Teodoro, Adriano Buzutti, Liliane Lima, Andréa Gigante, Flávio Caires, Danilo Gomes pela amizade e convívio

Aos colegas do grupo FRITZ FEIGL Vitor Hugo, Tiago Catelani, Natália Vieira, Nathália Castro, Lilia Guevara, Carla Baricala e Guilherme Pegler.

Aos amigos de doutorado, especialmente para Gerardo Magela, Mayara Ruy, José Rufino, Marcos Marçal, Rodrigo Sequinel, Teresinha Aguiar, Viviane Raïssa, Fernando Cotinguiba, Ângela Martins, Cristiana da Silva, Vanessa Chapla, Juliana Gubiani, Flávio Bedatty pela troca de informações e companheirismo.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Química pela amizade e momentos de descontração.

A CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa (no Brasil e no exterior).

Enfim, àqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

*“O sábio tudo realiza e nada considera seu. Tudo faz e não se apega à sua obra. Não se prende aos frutos da sua atividade. Termina a sua obra e está sempre no princípio. E por isso sua obra prospera”.*

*(Lao - Tsé)*

## RESUMO

O produto comercial Roundup®, contendo o glifosato como principal ingrediente ativo, é vendido mundialmente por ser um herbicida sistêmico, pós-emergente e não seletivo. Além disso, a alta eficiência no processo de remoção de plantas indesejadas e o aumento de culturas transgênicas favorecem seu uso extensivo. Embora não seja considerado um sério contaminante para o homem, o controle e monitoramento destes herbicidas são muito importantes. Desta forma, o presente projeto propõe o desenvolvimento de sistemas de *screening* e métodos analíticos limpos que possam ser aplicados à determinação de glifosato, uma vez que a literatura dispõe de poucos métodos de análise que visam à aplicação dos princípios da Química Verde. Os métodos propostos neste estudo foram espectroscopia de reflectância difusa, espectrofotometria e sistemas em fluxo, empregando análise por injeção em fluxo (FIA) e multi-bombas (MPFS), com detecção na região do UV-Vis. Os métodos de análise propostos são baseados na reação entre glifosato e *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC), em meio acidificado, com um máximo de reflexão ou absorção em 495 nm. Após a otimização das condições experimentais e validação dos métodos propostos, através de parâmetros como linearidade da curva analítica, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e estudos de possíveis íons interferentes, estes foram aplicados em amostras de herbicidas comerciais e águas (naturais e de consumo humano). Os resultados obtidos na determinação de glifosato nas amostras de herbicidas comerciais empregando reflectância difusa concordaram com os resultados obtidos empregando análise por injeção em fluxo, os quais apresentaram teores de 378,8 g L<sup>-1</sup> para a amostra A, 392,4 g L<sup>-1</sup> para a amostra B e 330,6 g L<sup>-1</sup> para a amostra C, com desvios padrão relativo de 3,2 %; 4,3 % e 3,2 %, respectivamente. Embora, não tenha sido possível avaliar a exatidão dos métodos propostos empregando método comparativo, os resultados obtidos foram considerados satisfatórios devido às boas faixas de recuperação obtidas: de 93,2 % a 102,6 % empregando reflectância difusa e 91,0 % a 110 % empregando análise por injeção em fluxo. Para a aplicação da espectroscopia de reflectância difusa em amostras de águas foi necessária a utilização de pré-tratamento (extração e pré-concentração). A aplicação do sistema em fluxo empregando multi-bombas, a utilização de amostragem binária, cela de fluxo de longo percurso óptico e parada de fluxo neste sistema possibilitou uma boa sensibilidade e, conseqüentemente, análise direta das amostras. Dentre as amostras de águas analisadas apenas uma amostra de água de rio apresentou teor de glifosato de 2,25 mg L<sup>-1</sup>. Métodos de adição de padrão também foram realizados e os resultados obtidos indicam que a faixa de recuperação

obtida (88,5 % a 104,5%) apresenta boa exatidão e os efeitos de matriz são insignificantes. Portanto, os métodos desenvolvidos apresentaram bom desempenho na determinação de glifosato nas formulações comerciais e nas amostras de águas naturais. Apesar de ter sido necessário o uso de pré-tratamento das amostras de água para a aplicação da espectroscopia de reflectância difusa, tanto este método como sistema em fluxo com multi-bombas foram métodos sensíveis para detectar glifosato em níveis ecotoxicológicos.

**Palavras-chave:** espectroscopia de reflectância difusa, *spot test*, espectrofotometria, sistema em fluxo, glifosato.

## ABSTRACT

The commercial product Roundup®, containing the glyphosate as its main active ingredient, is marketed worldwide because it is a nonsystemic, post-emergent and nonselective herbicide. Moreover, the high efficiency in the process of the removal of unwanted plants and the increase in the introduction transgenic plants favor their extensive use. Although it has not been considered a serious contaminant to humans the control and monitoring of this herbicide are very important. The present project proposes the development of screening systems and clear analytical methods that can be applied to determine the presence of glyphosate, since in the literature there are few methods of analysis that apply Green Chemistry's principles. The proposed methods in this study were diffuse reflectance spectroscopy, spectrophotometry and flow systems, employing flow injection analysis (FIA) and multi-pumping (MPFS), with detection in the Uv-vis region. The proposed analysis methods are based in the reaction between glyphosate and *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (*p*-DAC), in acid medium, it presents a reflection or absorption maximum in 495 nm. After the optimization of the experimental conditions and validation of the proposed methods, through parameters such as: linearity of the analytical curve, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantification, recovery and study of possible interference ions, these were applied to commercial herbicides and water samples (naturals and for human consumption). The results obtained in the determination of glyphosate in the commercial herbicides employing diffuse reflectance were agree with the results obtained by employing flow injection analysis, which presented levels of 378.8 g L<sup>-1</sup> to the A sample, 392.4 g L<sup>-1</sup> to the B sample and 330.6 g L<sup>-1</sup> to the C sample, with relative standard deviation of 3.2 %, 4.3 % and 3.2 %, respectively. Although, it has not been possible to assess the accuracy of the proposed methods employing a comparative method, the results obtained were considered satisfactory due to the good ranges of recovery obtained: of 93.2 % to 102.6 % employing diffuse reflectance spectroscopy and 91.0 % to 110 % employing flow injection analysis. For the application of diffuse reflectance spectroscopy in water samples it was necessary the utilization of pretreatment (extraction and preconcentration). The application of the flow system employing multi-pumpings, the utilization of binary sampling, long path way optical flow cell and stopped flow in this system possibilitated a good sensibility and consequently direct analysis of the samples. Among the water samples analyzed just only one river water sample presented levels of glyphosate of 2.25 mg L<sup>-1</sup>. Standard addition methods were also realized and the results obtained indicate that the range of recovery obtained (88.5 % to 104.5%) presents good accuracy and the matrix



effects are insignificant. Therefore, the developed methods presented good performance in the determination of glyphosate in the commercial formulations and in natural water samples. Even though it was necessary to use pretreatment of water samples in the application of the diffuse reflectance spectroscopy, this method and the multi-pumping flow system method were both sensitive to detect glyphosate in eco-toxicological levels.

**Keywords:** diffuse reflectance spectroscopy, spot test, spectrophotometry, flow system, glyphosate.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Mapa da localização das empresas produtoras de defensivos agrícolas	36
<b>Figura 2.</b>	Venda de agrotóxicos em diferentes classes como produto comercial	39
<b>Figura 3.</b>	Fórmula estrutural do glifosato	40
<b>Figura 4.</b>	Ingredientes ativos mais comercializados no Brasil em 2009	41
<b>Figura 5.</b>	Mapa de comercialização de glifosato e seus sais por Estado em 2009	42
<b>Figura 6.</b>	Transporte do glifosato via floema, em plantas daninhas	46
<b>Figura 7.</b>	Mecanismo de ação do glifosato em plantas	48
<b>Figura 8.</b>	Dissociação do glifosato	51
<b>Figura 9.</b>	Rotas de decomposição do glifosato	53
<b>Figura 10.</b>	Distribuição das publicações de glifosato de acordo com os métodos de análise utilizado	55
<b>Figura 11.</b>	Esquema de conversão do glifosato em seu respectivo derivado	58
<b>Figura 12.</b>	Substituição nucleofílica do glifosato com NBD-Cl	62
<b>Figura 13.</b>	Espectro de absorção da solução do branco e do produto reacional	68
<b>Figura 14.</b>	Provável mecanismo de reação entre glifosato e ditiocarbamato	69
<b>Figura 15.</b>	Esquema de um sistema de <i>screening</i> de amostras contendo concentrações menor e maior que $2 \text{ ng g}^{-1}$ de analito	73
<b>Figura 16.</b>	Radiação difusa refletida	76
<b>Figura 17.</b>	Suporte utilizado no preparo dos <i>spot tests</i>	80
<b>Figura 18.</b>	Metodologia de preparo dos <i>spot tests</i> e ordem de adição das soluções empregadas para a obtenção do produto reacional	81
<b>Figura 19.</b>	Estrutura do <i>p</i> -DAC	82
<b>Figura 20.</b>	Espectro de absorção do produto reacional obtido em <i>spot test</i> , empregando concentração de glifosato de $500 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,01 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ , em meio acidificado com HCl	83
<b>Figura 21.</b>	Espectro de absorção do produto reacional obtido em <i>spot test</i> , empregando concentração de glifosato de $500 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,01 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ , em meio acidificado com HAc	84
<b>Figura 22.</b>	Gráfico, tridimensional, da superfície de resposta das variáveis <i>p</i> -DAC e HAc	88

<b>Figura 23.</b>	Gráfico da curva de nível correspondente à superfície de resposta da Figura 22	89
<b>Figura 24.</b>	Estabilidade do produto reacional por um período de 60 minutos	90
<b>Figura 25.</b>	Curva analítica obtida para a determinação de glifosato, empregando faixa de concentração de $2,00 \times 10^2 \text{ mg L}^{-1}$ a $2,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$	91
<b>Figura 26.</b>	Curva de calibração empregada para a determinação de glifosato, obtida a partir da aplicação da equação logarítmica nos dados da curva analítica apresentada na Figura 25	92
<b>Figura 27.</b>	Esquema do mecanismo de reação entre glifosato e <i>p</i> -DAC	102
<b>Figura 28.</b>	Espectro obtido, em <i>spot test</i> , do produto da reação entre glifosato ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) e <i>p</i> -DAC, em meio de HAc, empregando aquecimento	103
<b>Figura 29.</b>	Gráfico da superfície de resposta das variáveis tempo e temperatura de aquecimento, empregando concentração de glifosato de $200 \text{ mg L}^{-1}$ , <i>p</i> -DAC 0,142 % e HAc $4,09 \text{ mol L}^{-1}$ .	104
<b>Figura 30</b>	Curva de nível da superfície de resposta referente à Figura 29	104
<b>Figura 31.</b>	Estabilidade do produto reacional entre glifosato ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), <i>p</i> -DAC (0,142 %) e HAc ( $4,09 \text{ mol L}^{-1}$ ) com aquecimento em estufa por 8 minutos à $45 \text{ }^\circ\text{C}$	106
<b>Figura 32.</b>	Curva analítica empregada para a determinação de glifosato na faixa de concentração de $50 \text{ mg L}^{-1}$ a $500 \text{ mg L}^{-1}$ e seus respectivos desvios ( $n = 3$ ), empregando espectroscopia de reflectância difusa	107
<b>Figura 33.</b>	Efeito de cátions interferentes empregando espectroscopia de reflectância difusa	109
<b>Figura 34.</b>	Efeito de ânions interferentes empregando espectroscopia de reflectância difusa	110
<b>Figura 35.</b>	Determinação de glifosato na amostra A por adição de padrão e recuperação	112
<b>Figura 36.</b>	Espectro de absorção entre glifosato ( $101 \text{ mg L}^{-1}$ ) e <i>p</i> -DAC (0,035 %) em HAc ( $6,000 \text{ mol L}^{-1}$ ), com e sem a presença de SDS ( $5,1 \times 10^{-3}$ ) no meio reacional	122
<b>Figura 37.</b>	Gráfico de Pareto do planejamento composto central, empregando concentração de glifosato de $101 \text{ mg L}^{-1}$	123
<b>Figura 38.</b>	Gráfico de superfície de resposta obtido com os dados da matriz experimental, empregando concentração de glifosato de $101 \text{ mg L}^{-1}$	124
<b>Figura 39.</b>	Curva de nível da superfície de resposta referente à Figura 38	125
<b>Figura 40.</b>	Gráfico de superfície de resposta obtido com os dados da segunda matriz experimental, empregando concentração de glifosato de $101 \text{ mg L}^{-1}$	125
<b>Figura 41.</b>	Curva de nível da superfície de resposta referente à Figura 40	126

<b>Figura 42.</b>	Estudo da estabilidade da solução do branco por 90 minutos, empregando concentração de <i>p</i> -DAC 0,042 % e HAc 10,0 mol L <sup>-1</sup>	127
<b>Figura 43.</b>	Estudo da estabilidade do produto reacional por 90 minutos, empregando concentração de <i>p</i> -DAC 0,042 % e HAc 10,0 mol L <sup>-1</sup> e concentração de glifosato de 101 mg L <sup>-1</sup>	128
<b>Figura 44.</b>	Provável mecanismo da reação entre glifosato e ninidrina, na presença de molibdato de sódio	134
<b>Figura 45.</b>	Espectro de absorção da reação entre glifosato (25,2 mg L <sup>-1</sup> ) e ninidrina (5,001 % m/v), na presença de molibdato de sódio (5,000 % m/v)	135
<b>Figura 46.</b>	Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> )	136
<b>Figura 47.</b>	Gráficos dos efeitos principais das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> )	137
<b>Figura 48.</b>	Gráficos dos efeitos de interações entre as variáveis estudadas no planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> )	138
<b>Figura 49.</b>	Curva analítica obtida para a aplicação da espectrofotometria UV-Vis	140
<b>Figura 50.</b>	Diagrama de fluxo do sistema FIA usado na determinação de glifosato. IC: injetor comutador; L: alça de amostragem (50 cm); A: solução padrão de glifosato ou amostra (0,7 mL min <sup>-1</sup> ); Re: reator (100 cm x 0,8 mm d.i.); B: bomba peristáltica; D: descarte e Det: detector (495 nm)	148
<b>Figura 51.</b>	Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial fracionário (2 <sup>5-1</sup> )	153
<b>Figura 52.</b>	Gráficos dos efeitos principais das variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário (2 <sup>5-1</sup> )	154
<b>Figura 53.</b>	Gráficos dos efeitos de interações entre as variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário (2 <sup>5-1</sup> )	154
<b>Figura 54.</b>	Gráfico de Pareto obtido no planejamento experimental 2 <sup>3</sup>	155
<b>Figura 55.</b>	Gráficos dos efeitos principais das variáveis obtido no planejamento experimental 2 <sup>3</sup>	156
<b>Figura 56.</b>	Gráficos dos efeitos de interações entre as variáveis obtidas no planejamento experimental 2 <sup>3</sup>	157
<b>Figura 57.</b>	Sinais transientes da curva analítica obtidos no sistema FIA	159
<b>Figura 58.</b>	Curva analítica obtida empregando análise por injeção em fluxo por linha única	159
<b>Figura 59.</b>	Diagrama de fluxo do sistema MPFS usado na determinação de glifosato. A: amostra; Re: reagente; C: solução carregadora; Pi: micro-bombas; x: ponto de confluência; R: reator (190 cm); LWCC: célula de fluxo e D: descarte	169

<b>Figura 60.</b>	Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial fracionário ( $2^{9-5}$ )	175
<b>Figura 61.</b>	Gráficos dos efeitos principais das variáveis obtido no planejamento fatorial fracionário ( $2^{9-5}$ )	176
<b>Figura 62.</b>	Gráficos dos efeitos de interações entre as variáveis obtido no planejamento fatorial fracionário ( $2^{9-5}$ )	177
<b>Figura 63.</b>	Gráfico de Pareto em função dos desvios experimentais ( $n = 3$ )	179
<b>Figura 64.</b>	Sinais transientes da curva analítica obtidos no sistema de multi-bombas	180
<b>Figura 65.</b>	Curva analítica obtida empregando sistema em fluxo com multi-bombas	181
<b>Figura 66.</b>	Estudo dos possíveis cátions interferentes empregando MPFS	182
<b>Figura 67.</b>	Estudo dos possíveis ânions interferentes empregando MPFS	183
<b>Figura 68.</b>	Estudo de glufosinato e AMPA como possíveis íons interferentes empregando MPFS	183
<b>Figura 69.</b>	Espectro de absorção do glifosato na região do UV-Vis, nas concentrações de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $50,0 \text{ mg L}^{-1}$	203
<b>Figura 70.</b>	Curva analítica obtida experimentalmente, na aplicação do método comparativo, conforme descrito na literatura <sup>38</sup>	208
<b>Figura 71.</b>	Curva analítica obtida pelo método comparativo obtida pelos pesquisadores Bhaskara e Nagaraja <sup>38</sup>	208

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Características de alguns trabalhos, descrito na literatura, empregando cromatografia gasosa	59
<b>Tabela 2.</b>	Características de alguns trabalhos, descrito na literatura, empregando cromatografia de íons	61
<b>Tabela 3.</b>	Características de alguns trabalhos, descrito na literatura, empregando cromatografia líquida	63
<b>Tabela 4.</b>	Características de alguns trabalhos, descrito na literatura, empregando cromatografia líquida de alta eficiência	65
<b>Tabela 5.</b>	Características de alguns trabalhos, descritos na literatura, empregando eletroforese capilar	67
<b>Tabela 6.</b>	Níveis estabelecidos no planejamento experimental para as variáveis <i>p</i> -DAC e HAc	85
<b>Tabela 7.</b>	Matriz utilizada para a obtenção da superfície de resposta, valores de reflectância difusa e os respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3)	85
<b>Tabela 8.</b>	Concentrações dos reagentes em condições ótimas de trabalho e seus respectivos valores de reflectância difusa (495 nm)	89
<b>Tabela 9.</b>	Parâmetros instrumentais e figuras de mérito obtidos com os ensaios preliminares com espectroscopia de reflectância difusa	93
<b>Tabela 10.</b>	Concentração obtida a partir da extração do glifosato, em meio ácido, em diferentes pHs	94
<b>Tabela 11.</b>	Concentração obtida a partir da diluição das amostras de herbicidas comerciais, em meio ácido, em diferentes pHs	95
<b>Tabela 12.</b>	Níveis estabelecidos no planejamento experimental para as variáveis tempo e temperatura de aquecimento	97
<b>Tabela 13.</b>	Matriz utilizada para a obtenção das condições ótimas de aquecimento dos <i>spot tests</i>	98
<b>Tabela 14.</b>	Parâmetros instrumentais e figuras de mérito obtidas por espectroscopia de reflectância difusa, com aquecimento dos <i>spot tests</i> em estufa por 8 minutos à 45 °C	108
<b>Tabela 15.</b>	Efeito das espécies interferentes em amostras de águas e amostras de herbicidas comerciais contendo 200 mg L <sup>-1</sup> de solução padrão de glifosato	110

<b>Tabela 16.</b>	Concentração e valores de reflectância difusa obtidos na determinação de glifosato nas amostras de herbicidas comerciais e os respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3)	111
<b>Tabela 17.</b>	Resultados de recuperação obtidos em amostras de herbicidas comerciais	113
<b>Tabela 18.</b>	Resultados de recuperação obtidos em amostras de águas de rio, após o pré-tratamento empregando extração em fase sólida	114
<b>Tabela 19.</b>	Resultados de recuperação de glifosato obtidos em amostras de água pura e mineral e seus respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3)	115
<b>Tabela 20.</b>	Níveis estabelecidos no planejamento experimental para a detecção do glifosato em 495 nm	120
<b>Tabela 21.</b>	Matriz experimental empregando detecção espectrofotométrica com valores de absorvância (495 nm) e os respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3)	120
<b>Tabela 22.</b>	Níveis estabelecidos no planejamento experimental sob novas condições de análise	121
<b>Tabela 23.</b>	Matriz experimental sob novas condições de análise com valores de absorvância (495 nm) e os respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3)	121
<b>Tabela 24.</b>	Matriz experimental empregando planejamento fatorial completa ( $2^3$ ) e média dos valores de absorvância obtida para cada ensaio (n = 2)	132
<b>Tabela 25.</b>	Condições experimentais otimizadas para a aplicação da espectrofotometria UV-Vis	138
<b>Tabela 26.</b>	Resultados obtidos com na aferição do forno de microondas, empregando potência média alta	139
<b>Tabela 27.</b>	Valores de absorvância de cada replicata obtidos nas medidas analíticas	140
<b>Tabela 28.</b>	Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental $2^{5-1}$	149
<b>Tabela 29.</b>	Matriz das variáveis estudadas, valores de absorvância e os respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3) de todos os experimentos	149
<b>Tabela 30.</b>	Matriz utilizada no planejamento fatorial completo ( $2^3$ ), valores de absorvância e os respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3) de todos os experimentos	150
<b>Tabela 31.</b>	Variáveis estudadas com suas respectivas condições experimentais otimizadas pelo planejamento fatorial fracionário ( $2^{5-1}$ )	155
<b>Tabela 32.</b>	Variáveis estudadas com suas respectivas condições experimentais pelo planejamento fatorial completo ( $2^3$ )	157
<b>Tabela 33.</b>	Concentração e valores de absorvância (495 nm) obtidos na construção da curva de calibração para a determinação de glifosato nas amostras de herbicidas comerciais por FIA	158

<b>Tabela 34.</b>	Parâmetros instrumentais e figuras de mérito obtidos para a aplicação do sistema FIA	160
<b>Tabela 35.</b>	Determinação de glifosato em formulações comerciais	161
<b>Tabela 36.</b>	Determinação de glifosato em formulações comerciais pelo método proposto e métodos espectrofotométricos	162
<b>Tabela 37.</b>	Resultados de recuperação de glifosato em formulações comerciais	163
<b>Tabela 38.</b>	Procedimento automático	170
<b>Tabela 39.</b>	Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental $2^{9-5}$	171
<b>Tabela 40.</b>	Matriz utilizada no planejamento fatorial fracionário ( $2^{9-5}$ )	172
<b>Tabela 41.</b>	Variáveis estudadas com suas respectivas condições experimentais otimizadas pelo planejamento fatorial fracionário ( $2^{9-5}$ )	178
<b>Tabela 42.</b>	Concentração e valores de absorbância (495 nm) obtidos na determinação de glifosato nas amostras de águas naturais de consumo humano	180
<b>Tabela 43.</b>	Parâmetros instrumentais e figuras de mérito obtidos para a aplicação do sistema MPFS	181
<b>Tabela 44.</b>	Efeito das espécies interferentes em amostras de águas (naturais e de consumo humano) contendo $4,1 \text{ mg L}^{-1}$ de solução padrão de glifosato	184
<b>Tabela 45.</b>	Resultados de recuperação de glifosato adicionado nas amostras de água empregando MPFS	186
<b>Tabela 46.</b>	Resultados obtidos pelo método proposto (MPFS) e método oficial (HPLC) na determinação de glifosato em amostras de água	187



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido indolacético
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C <sub>18</sub>	grupo octadecilsilano ligado a sílica
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CNBF	4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto
CP4	Proteína presente plantas transgênicas
CR	Comprimento do reator
CTAB	N-cetiltrimetilamônio
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPR	Desvio padrão relativo
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPSP	Enzima <i>5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate</i>
ERD	Espectroscopia de reflectância difusa
ESI	<i>Eletrospray Ionization</i>
F	Solução de amostra fortificada
FD	<i>Fluorescence Detection</i>
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
FMOC-Cl	9-fluorenil-metil cloroformato
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HMDE	<i>Hanging Mercury Drop Electrode</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAR	Intervalo de pulso das soluções de amostra e reagente
IC	Intervalo de pulso da solução carregadora
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K <sub>f</sub>	Coefficiente de adsorção de Freundlich

KL Coeficiente de adsorção de Langmuir

LC *Liquid Chromatography*

LD Limite de detecção

LQ Limite de quantificação

MPFS *Multi-pumping Flow System*

MS *Mass Spectrometry*

MS Ministério da Saúde

NAR Número de pulso das soluções de amostra e reagente

NBD-Cl *4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole*

NC Número de pulso da solução carregadora

NDA Naftaleno-2,3-dicarboxaldeído

NF Solução de amostra não fortificada

OGMs Organismos geneticamente modificados

ONU Organizações das Nações Unidas

OPA *o-phthalaldehyde*

OPA-MERC *o-phthalaldehyde mercaptoethanol*

p.m.a potência média-alta

p-DAC *p*-dimetilaminocinamaldeído

PF Tempo de parada de fluxo

POEA Polietoxietileno amina

SDS Dodecil sulfato de sódio

SIA *Sequential Injection Analysis*

SINDAG Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SPE *Solid Phase Extraction*

TFAA Trifluoroacético anidro

TFE Trifluoroetanol

US EPA *United States Environmental Protection Agency*

UV Ultravioleta

Vis Visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

Abs radiação absorvida

$A_R$  Radiação refletida

$\epsilon$  Absortividade molar

$c$  calor específico da água

$C$  Concentração

$K$  Coeficiente de absorção molar

$\lambda_{\text{máx}}$  Comprimento de onda de máximo absorção

$K_{ow}$  Coeficiente de partição octanol/água

$m$  massa

$P$  Potência

pH Potencial de hidrogênio iônico

$P_i$  micro-bombas

$pK_i$  Constante de dissociação

$R$  Coeficiente de correlação linear

$S$  Coeficiente de dispersão

$s$  Desvio padrão

$S$  Inclinação da curva analítica

$t$  tempo de aquecimento (s)

$\Delta t$  Variação de temperatura

$T_R$  Radiação transmitida

$X'$  Logaritmo da concentração padrão de glifosato ( $\text{mol L}^{-1}$ )

$Z$  Valor de reflectância difusa do modelo matemático

## SUMÁRIO

	<b>ASPECTOS GERAIS</b>	<b>32</b>
<b>1</b>	<b>DEFENSIVOS AGRÍCOLAS</b>	<b>35</b>
1.1	USO DE HERBICIDAS NA AGRICULTURA: ASPECTOS POSITIVOS E NEGATIVOS	35
1.2	EFEITOS NA SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE	37
<b>2</b>	<b>A MOLÉCULA GLIFOSATO</b>	<b>40</b>
2.1	SURGIMENTO E IMPOTÊNCIA	40
2.2	MERCADO NACIONAL E INTERNACIONAL	41
2.3	APLICAÇÃO DIRIGIDA	43
2.3.1	Uso em Culturas Diversas	44
2.3.2	Uso no Controle de Plantas Daninhas	44
2.3.3	Uso no Controle de Plantas Aquáticas	44
2.4	MODO DE APLICAÇÃO	45
2.5	MECANISMO DE AÇÃO	47
2.6	PLANTAS RESISTENTES AO USO DO GLIFOSATO	49
2.7	DINÂMICA DO GLIFOSATO NO MEIO AMBIENTE	50
2.7.1	Contaminação de Águas Naturais	51
2.7.2	Comportamento do Glifosato em Solos	52
2.8	EFEITOS TÓXICOLÓGICOS DO GLIFOSATO	54
<b>3</b>	<b>LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO</b>	<b>55</b>
3.1	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	56
3.1.1	Cromatografia Gasosa (GC)	56
3.1.2	Cromatografia de Íons (IC)	59
3.1.3	Cromatografia Líquida (LC)	61
3.1.4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	63
3.2	ELETROFORESE CAPILAR	66
3.3	MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	67
3.4	OUTROS	69
<b>4</b>	<b>RELEVÂNCIA DO TEMA</b>	<b>72</b>
4.1	SISTEMAS DE <i>SCREENING</i> E QUÍMICA VERDE	72

<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>75</b>
5.1	OBJETIVO GERAL	75
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	75
<b>6</b>	<b>ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA</b>	<b>76</b>
6.1	PARTE EXPERIMENTAL (ENSAIOS PRELIMINARES)	77
6.1.1	Materiais e Equipamentos	77
6.1.2	Reagentes	78
6.1.3	Preparo das Soluções	79
6.1.3.1	Solução de <i>p</i> -DAC (0,087 % m/v) em HCl (0,0830 mol L <sup>-1</sup> )	79
6.1.3.2	Solução de <i>p</i> -DAC (0,135 % m/v) em HAc (3,00 mol L <sup>-1</sup> )	79
6.1.3.3	Soluções-padrão de glifosato	80
6.1.4	Preparo dos <i>Spot Tests</i>	80
6.1.5	Metodologia Empregada	81
6.1.5.1	Aplicação do ácido clorídrico (HCl)	82
6.1.5.2	Aplicação do ácido acético (HAc)	83
6.1.5.3	Planejamento experimental	84
6.1.5.4	Estabilidade do produto da reação	86
6.1.5.5	Aquisição e preparo das amostras para análise	86
6.1.5.5.1	<i>Empregando pré-tratamento da amostra</i>	86
6.1.5.5.2	<i>Sem pré-tratamento da amostra</i>	87
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO OBTIDOS COM OS ENSAIOS PRELIMINARES	87
6.2.1	Planejamento Experimental	87
6.2.2	Estabilidade do Produto Reacional	90
6.2.3	Curva Analítica	90
6.2.4	Validação do Método	92
6.3	PARTE EXPERIMENTAL EMPREGANDO NOVAS CONDIÇÕES DE TRABALHO	96
6.3.1	Soluções Padrão de Glifosato	96
6.3.2	Solução de <i>p</i> -DAC (0,142 % m/v) em HAc (4,00 mol L <sup>-1</sup> )	96
6.3.3	Preparo dos <i>Spot Tests</i>	97
6.3.4	Otimização das Variáveis Envolvidas na Etapa de Aquecimento dos <i>Spot Tests</i>	97

6.3.5	Estudo da Estabilidade do Produto Reacional	98
6.3.6	Estudo de Íons Interferentes	98
6.3.6.1	Formulações comerciais	98
6.3.6.2	Amostras de águas naturais	99
6.3.7	Preparo das Amostras para Análise	99
6.3.7.1	Preparo das amostras de herbicidas	99
6.3.7.2	Preparo das amostras ambientais	100
6.3.7.3	Preparo das amostras de águas pura e minerais	101
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS DADOS ALCANÇADOS	101
6.4.1	Otimização das Condições Experimentais	103
6.4.2	Estudo da Estabilidade do Produto Reacional	105
6.4.3	Curva Analítica e Validação do Método	106
6.4.4	Estudo dos Íons Interferentes	108
6.4.5	Aplicação do Método Proposto	111
6.5	CONCLUSÃO	116
<b>7</b>	<b>MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS</b>	<b>117</b>
7.1	EMPREGANDO A REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO E <i>p</i> -DAC	118
7.1.1	Parte Experimental	118
7.1.1.1	Materiais e equipamentos	118
7.1.1.2	Reagentes	118
7.1.1.3	Preparo das soluções	119
7.1.1.3.1	<i>Solução-padrão estoque de glifosato (504 mg L<sup>-1</sup>)</i>	119
7.1.1.3.2	<i>Solução estoque de ácido acético (6,000 mol L<sup>-1</sup>)</i>	119
7.1.1.4	Metodologia empregada	119
7.1.1.5	Otimização das condições experimentais	119
7.1.1.6	Estudo da estabilidade do produto reacional	122
7.1.2	Resultados e Discussão dos Dados	122
7.1.2.1	Otimização das condições experimentais	123
7.1.2.2	Estudo da estabilidade do produto reacional	127
7.2	EMPREGANDO A REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO E NINIDRINA	130
7.2.1	Parte Experimental	130

7.2.1.1	Materiais e equipamentos	130
7.2.1.2	Reagentes	130
7.2.1.3	Preparo das soluções	130
7.2.1.3.1	<i>Solução estoque de molibdato de sódio (5,000 % m/v)</i>	130
7.2.1.3.2	<i>Solução estoque de ninidrina (5,001 % m/v)</i>	131
7.2.1.3.3	<i>Solução-padrão estoque de glifosato (404 mg L<sup>-1</sup>)</i>	131
7.2.1.4	Metodologia empregada	131
7.2.1.5	Otimização das condições experimentais	132
7.2.1.6	Aquecimento das soluções no forno de microondas	133
7.2.1.7	Aferição da potência do forno de microondas	133
7.2.2	Resultados e Discussão	134
7.2.2.1	Otimização das condições experimentais	135
7.2.2.2	Aferição da potência do forno de microondas	139
7.2.2.3	Curva analítica	139
<b>8</b>	<b>SISTEMAS EM FLUXO</b>	<b>142</b>
8.1	EMPREGANDO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO	144
8.1.1	Parte Experimental	144
8.1.1.1	Materiais e equipamentos	144
8.1.1.2	Reagentes	145
8.1.1.3	Preparo das soluções	146
8.1.1.3.1	<i>Solução de p-DAC (0,15%) em HCl (0,05 mol L<sup>-1</sup>)</i>	146
8.1.1.3.2	<i>Soluções padrão de glifosato</i>	146
8.1.1.3.3	<i>Solução de ninidrina (5%)</i>	146
8.1.1.3.4	<i>Solução de molibdato de sódio (5%)</i>	147
8.1.1.3.5	<i>Solução de nitrito de sódio (0,2 N)</i>	147
8.1.1.3.6	<i>Solução de brometo de potássio (25%)</i>	147
8.1.1.4	Metodologia empregada	147
8.1.1.5	Planejamento experimental	148
8.1.1.6	Estudo de íons interferentes nas formulações comerciais	150
8.1.1.7	Aquisição e preparo das amostras para análise	151
8.1.1.7.1	<i>Análise das amostras por FIA</i>	151

8.1.1.7.2	<i>Análise das amostras por espectrofotometria Uv-vis (570 nm)</i>	151
8.1.1.7.3	<i>Análise das amostras por espectrofotometria Uv (243 nm)</i>	152
8.1.2	Resultados e Discussão	152
8.1.2.1	Otimização das condições experimentais	152
8.1.2.2	Curva analítica e validação do método proposto	158
8.1.2.3	Estudo dos possíveis íons interferentes	160
8.1.2.4	Aplicação do método proposto	161
8.1.2.5	Aplicação de métodos comparativo	161
8.1.2.6	Estudo de adição de padrão e recuperação	163
8.1.3	Conclusão	164
8.2	EMPREGANDO SISTEMA EM FLUXO EMPREGANDO MULTI-BOMBAS	165
8.2.1	Parte Experimental	165
8.2.1.1	Materiais e equipamentos	165
8.1.2.3	Reagentes	166
8.2.1.3	Preparo das soluções	167
8.2.1.3.1	<i>Solução de p-DAC (226 mg L<sup>-1</sup>)</i>	167
8.2.1.3.2	<i>Soluções padrão de glifosato</i>	167
8.2.1.3.3	<i>Soluções tampão de borato de sódio (0,0500 mol L<sup>-1</sup>)</i>	167
8.2.1.3.4	<i>Solução de 9-metilcloroformato (1,00 g L<sup>-1</sup>)</i>	168
8.2.1.3.5	<i>Solução da fase móvel empregado em HPLC</i>	168
8.2.1.4	Metodologia empregada	168
8.2.1.5	Planejamento experimental	170
8.2.1.6	Estudo de íons interferentes	172
8.2.1.7	Aquisição e preparo das amostras para análise	173
8.2.1.7.1	<i>Preparo das amostras para análise por fluxo</i>	173
8.2.1.7.2	<i>Preparo das amostras para análise pelo método oficial</i>	173
8.2.2	Resultados e Discussão	174
8.2.2.1	Otimização das condições experimentais	175
8.2.2.2	Curva analítica e validação do método proposto	179
8.2.2.3	Estudo dos íons interferentes	182
8.2.2.4	Aplicação do método proposto	185



8.2.2.4.1	<i>Adição de padrão e recuperação</i>	185
8.2.2.5	Aplicação do método oficial	187
8.2.3	Conclusão	188
9	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>189</b>
10	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>191</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>192</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>202</b>

## ASPECTOS GERAIS

A contaminação de águas e solos caracterizada pela distribuição ou dispersão de agrotóxicos no meio ambiente, é particularmente preocupante devido aos níveis de poluição ambiental decorrentes da intensificação de atividades agrícolas. Os sinais da presença desse tipo de poluição só se tornam perceptíveis quando esta já se encontra em estágio bem avançado. É o que ocorre com herbicidas inorgânicos e organometálicos, por exemplo, que tiveram seu uso proibido, principalmente os que envolviam os elementos químicos cobre e arsênio em sua formulação por serem considerados bioacumulativos ao longo da cadeia alimentar<sup>1,2</sup>.

Devido à persistência desses metais no ambiente e o interesse no aumento da produção de alimentos, para suprir as necessidades básicas, e atender o crescimento populacional, novos produtos químicos foram desenvolvidos. Em consequência disso, surgiu a preocupação, por parte da população, com o uso em larga escala desses produtos nos alimentos, devido à grande quantidade de irregularidades encontradas na sua aplicação, bem como a necessidade de informações sobre a qualidade dos produtos que estão sendo consumidos<sup>3</sup>.

Os herbicidas organofosforados foram os primeiros a substituírem os herbicidas organoclorados, por serem considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs), ou seja, compostos que apresentam alta estabilidade e que persistem no ambiente por um longo período de tempo. Já os herbicidas organofosforados, por conter ésteres de ácido fosfórico e outros sais à base de fósforo não são persistentes. Seu uso indiscriminado baseia-se no fato de serem mais tóxicos para plantas daninhas sem causar prejuízo à vegetação desejável<sup>1,4</sup>.

Embora os herbicidas organofosforados apresentem menores riscos ao meio ambiente em relação aos organoclorados, os mesmos apresentam maior toxicidade aos seres humanos, especialmente as pessoas que os manipulam, e para algumas espécies de mamíferos.

Popularmente conhecidos como defensivos agrícolas, pesticidas ou praguicidas, os agrotóxicos são compostos químicos que contêm em sua composição substâncias que interferem na atividade biológica dos seres vivos alvo de controle<sup>5</sup>.

As indústrias produtoras de agrotóxicos crescem a cada ano e o Brasil, em 2008, foi considerado o maior produtor do mundo. Embora não se possa negar o crescimento do país, em termos de produtividade, proporcionado pelo uso de agrotóxico no campo, seu uso indiscriminado pode promover impactos ambientais significativos devido à grande quantidade de substâncias que são lançadas no meio ambiente.

Atualmente, mais de um bilhão de litros de agrotóxicos são utilizados em diferentes culturas<sup>6</sup>, portanto, o emprego de metodologias analíticas alternativas para o monitoramento desses compostos orgânicos é de suma importância, uma vez que os alimentos quando expostos aos agrotóxicos, dependendo do perfil toxicológico, do grau de contaminação e/ou tempo de exposição durante sua aplicação, podem causar sérios danos à saúde humana e ao meio ambiente<sup>4,7</sup>.

Neste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de sistemas de *screening* e métodos analíticos simples, rápidos, eficientes e de baixo custo que possam ser aplicados à determinação de glifosato, um dos herbicidas mais usados no mundo, visando assim à aplicação dos princípios da Química Verde, ou seja, reduzir ao máximo a utilização de substâncias tóxicas e/ou à produção de resíduos que necessitam de tratamento de custo elevado e profissional especializado.

Os métodos analíticos empregados foram espectroscopia de reflectância difusa, espectrofotometria e sistemas em fluxo, empregando análise por injeção em fluxo e multi-bombas, com detecção na região do UV-Vis. Os métodos validados foram aplicados em amostras de águas (destinadas ao consumo humano e natural) bem como em amostras de herbicida contendo glifosato amplamente comercializados com resultados bastante satisfatórios.

O presente estudo foi dividido em tópicos para melhor compreensão do trabalho desenvolvido.

No Capítulo 1 está apresentado uma breve discussão sobre a utilização de defensivos agrícolas, abordando, principalmente, os aspectos positivos e negativos de seu uso em atividades agrícolas.

O Capítulo 2 mostra porque o glifosato tornou-se uma molécula de grande interesse comercial bem como as formas de ação, como herbicida potencial, e principais aplicações na agricultura brasileira.

O Capítulo 3 apresenta o levantamento bibliográfico dos principais métodos de análise do glifosato e uma breve discussão sobre os mesmos.

No Capítulo 4 está apresentado a importância do desenvolvimento de métodos alternativos para a determinação de glifosato.

No Capítulo 5 está descrito os objetivos alcançados com esta proposta de estudo.

Nos Capítulos 6, 7 e 8 estão apresentados os métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de glifosato em amostras de herbicidas comerciais e em amostras de água e os resultados obtidos.

No Capítulo 9 está a conclusão sobre o desenvolvimento do trabalho bem como dos resultados alcançados e no capítulo 10 está apresentado as perspectivas futuras.

## 1 – DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

Defensivos agrícolas ou agrotóxicos são substâncias químicas empregadas para controlar ou eliminar problemas decorrentes dos ataques de pragas e doenças nas plantas cultivadas, os quais visam o controle de seres vivos considerados indesejáveis em função da conservação de outros seres vivos, produtos ou ambiente<sup>5,8</sup>.

Com o passar do tempo novas tecnologias químicas surgiram e com isso algumas vantagens inerentes ao uso de agrotóxicos, como por exemplo, especificidade de ação e alta capacidade de degradação deste no ambiente. Entretanto, preocupações quanto às implicações de médio e longo prazo à saúde humana, decorrentes das exposições ocupacionais e ambientais a esses produtos foram crescentes por parte da população.

A ação toxicológica dos defensivos agrícolas, de acordo com o modo de ação, pode ser contra ácaros (acaricidas), algas (algicidas), bactérias (bactericidas), fungos (fungicidas), plantas (herbicidas), insetos (inseticidas), larvas de insetos (larvicidas), moluscos (moluscicidas), dentre outros<sup>1,5,8</sup>.

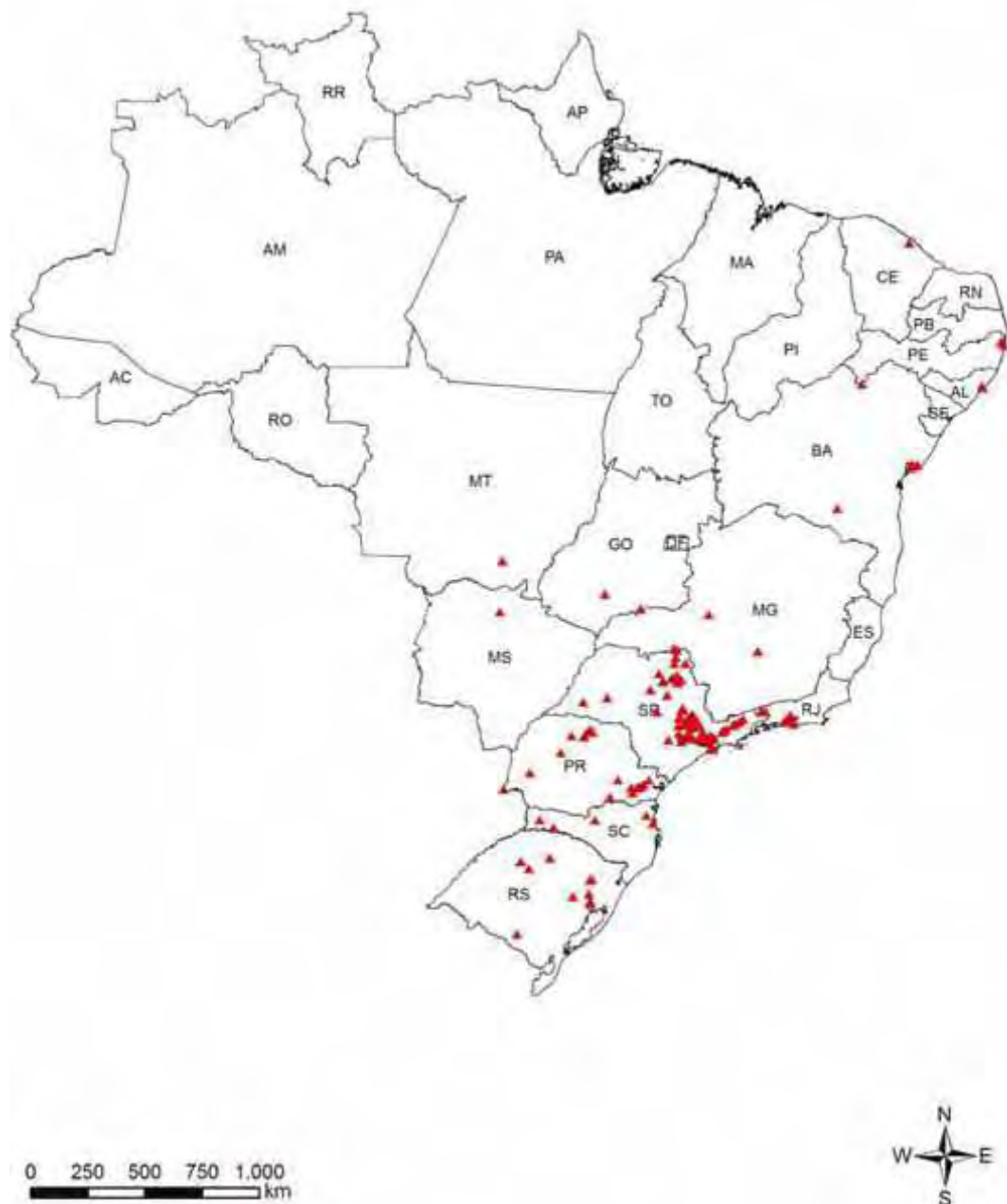
Em geral, estes defensivos inibem a atividade de uma enzima na célula dos organismos alvos de controle e, com isso, desenvolvem uma série de eventos que causam a morte ou inibição do desenvolvimento da célula e/ou do organismo em poucos dias ou semanas<sup>9,10</sup>. As enzimas são moléculas protéicas, relativamente grandes, as quais promovem um aumento da cinética das reações bioquímicas, possibilitando, desta forma, a ocorrência dessas reações nas células.

### 1.1 – USO DE HERBICIDAS NA AGRICULTURA: ASPECTOS POSITIVOS E NEGATIVOS

Os impactos sociais, ambientais e econômicos decorrentes do uso destas substâncias em atividade agrícola são bastante conhecidos e o perfil das formas de disponibilidade, acesso e utilização destes insumos no processo produtivo repercute diretamente sobre os vários interesses presentes nesse meio<sup>11</sup>.

Na agricultura brasileira, a cada ano a produção agrícola tende a um aumento neste setor em virtude da demanda dos insumos<sup>12</sup>, especialmente nas regiões sudeste, sul e centro-oeste (Figura 1). De acordo com essas informações, o estado de São Paulo é um dos

maiores consumidores no país devido ao clima favorável a produção de diferentes culturas em função da temperatura e dependendo do período do ano apresenta umidade relativamente elevada<sup>8,13</sup>.



**Figura 1.** Mapa de localização das empresas produtoras de defensivos agrícolas.

**Fonte:** Rebelo *et al.*<sup>8</sup>

Segundo Alves Filho<sup>11</sup> em seu livro lançado em 2002, a utilização de herbicida ainda gera muita polêmica sobre os reais prejuízos e benefícios causados pelo seu uso indiscriminado. De acordo com algumas indústrias produtoras, o emprego dessas substâncias na agricultura faz-se necessário por apresentar algumas vantagens, como por exemplo:

- Aumento da disponibilidade dos alimentos e diminuição dos seus custos;
- Aumento do lucro dos agricultores;
- Funciona melhor e mais rápido que outras alternativas;
- Produção de alimentos seguros.

Embora o uso de herbicida venha sendo bastante difundido, devido a essas vantagens, alguns ambientalistas, biólogos e engenheiros agrônomos citam que o seu uso é extremamente prejudicial por apresentar desvantagens, como por exemplo:

- Desenvolvem resistência genética;
- Convertem pragas secundárias em pragas primárias;
- Apresentam um círculo vicioso;
- Apresentam alta mobilidade no meio ambiente;
- Ameaças às vidas silvestres;
- Ameaças a curto e longo prazo à saúde humana pelo uso e fabricação de agrotóxicos.

## 1.2 – EFEITOS NA SAÚDE HUMANA E AMBIENTE

Segundo Domingues *et al.*<sup>5</sup>, a grande preocupação por parte dos fabricantes é desenvolver novas tecnologias para aumentar a produção agrícola, geralmente sem considerar os impactos à saúde e à segurança do trabalhador. No entanto, conforme Chagas<sup>14</sup> e Peres, Moreira e Cláudio<sup>15</sup>, isso acontece porque grande parte dos agricultores desconhece os riscos

impostos por esses produtos. Desta forma, negligenciam algumas normas básicas indispensáveis para a segurança do trabalhador.

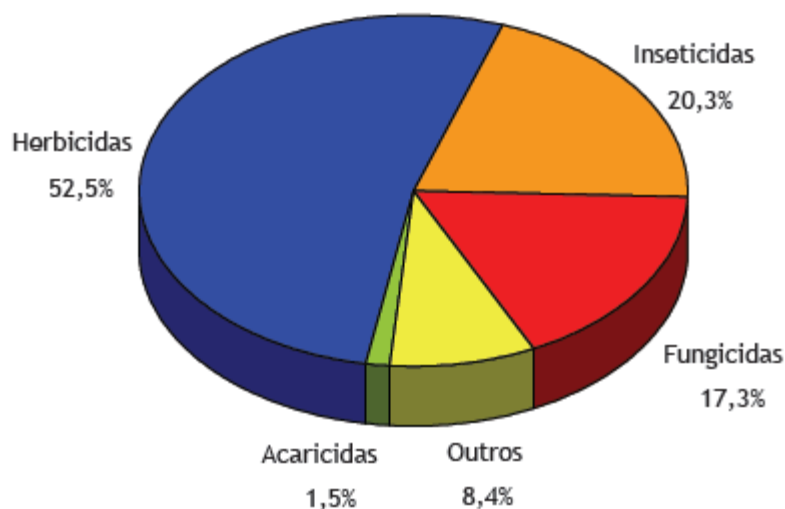
A intensificação dos problemas decorrentes do uso indiscriminado de agrotóxicos sobre a saúde pública e no ambiente podem ser consequências de alguns fatores<sup>14</sup>, tais como:

- Baixo nível de escolaridade;
- Falta de uma política de acompanhamento/aconselhamento técnico mais eficiente;
- Práticas exploratórias de propaganda e venda, por parte das indústrias produtoras e centros distribuidores de agrotóxicos;
- Desconhecimento de técnicas alternativas e eficientes de cultivo;
- Pouca atenção dada ao descarte de rejeitos e de embalagens;
- Utilização e/ou exposição continuada dos agrotóxicos;
- Teor eminentemente técnico do material informativo disponível às populações rurais;
- Ausência de iniciativas governamentais eficientes para prover assistência técnica continuada aos trabalhadores rurais;
- Falta de estratégias governamentais eficientes para controle da venda de agrotóxicos.

Campanhas contra o uso de compostos orgânicos tóxicos citam que o Brasil é o maior consumidor de defensivos agrícolas desde 2008 e mais de um bilhão de litros destes foram utilizados em lavouras, segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola (SINDAG)<sup>6,8</sup>.

Em 2010, esse consumo foi recorde de faturamento para a classe de herbicida, sendo responsável por 33,2% do consumo total de defensivos agrícolas no país (Figura 2), devido ao aumento de produtos agrícolas, tais como soja, milho de safra e safrinha, cana-de-açúcar, algodão, café, arroz de sequeiro e pastagem<sup>16</sup>.





**Figura 2.** Venda de agrotóxicos em diferentes classes como produto comercial.

**Fonte:** Análises e indicadores do agronegócio, com base nos dados fornecidos por SINDAG (2011).

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU) o Brasil é o principal destino dos agrotóxicos proibidos no exterior. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), quatro dentre dez produtos proibidos em culturas na União Européia e Estados Unidos, ainda são comercializados no Brasil. Desta forma, alguns defensivos, embora apresentem alta toxicidade, têm seu uso permitido, como por exemplo, o endossulfam que pode ser utilizados para fins agrícolas até 2013<sup>17</sup>.

O uso abusivo de defensivos agrícolas afeta, principalmente, a população rural e circunvizinha, já que podem desenvolver distúrbios neurológicos, respiratórios, cardíacos, pulmonares e no sistema endócrino<sup>18</sup>.

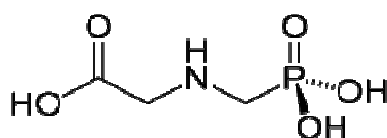
No ambiente, esses compostos podem promover desequilíbrio no ecossistema devido à extinção de algumas espécies de animais, erosão de solos e desertificação, contaminação de águas potável e águas de rio e ar, além do alimento produzido contendo resíduos dessas substâncias<sup>14,19</sup>.

## 2 – A MOLÉCULA GLIFOSATO

### 2.1 – SURGIMENTO E IMPORTÂNCIA

Dentre os vários tipos de herbicidas existentes até o momento o glifosato [N-(fosfometil)glicina] (Figura 3) por ser um herbicida sistêmico, pós-emergente e não seletivo tem sido amplamente empregado para fins agrícolas em função do alto controle de plantas infestantes bem como na disponibilidade de áreas para a prática do plantio direto<sup>20-22</sup>.

Um herbicida é considerado não seletivo quando o mesmo apresenta capacidade de controlar um grande conjunto de espécies de plantas daninhas. A ação em pós emergência corresponde ao controle de plantas já estabelecidas após aplicações direcionadas à parte aérea das plantas<sup>23</sup>.



**Figura 3.** Fórmula estrutural da glifosato.

**Fonte:** Aquino<sup>12</sup>.

Embora o glifosato tenha sido descoberto em 1950 por um químico suíço, Dr. Henri Martin, sua atividade herbicida foi comprovada somente em 1971, quando a empresa Monsanto desenvolveu um programa específico para obter um herbicida sistêmico, visando o controle de plantas daninha na agricultura<sup>23</sup>. Durante a realização deste programa, mais de 100 compostos derivados de ácido amino-metil fosfônico foram desenvolvidos, dentre os quais apenas duas moléculas apresentavam atividade herbicida em plantas daninhas perenes.

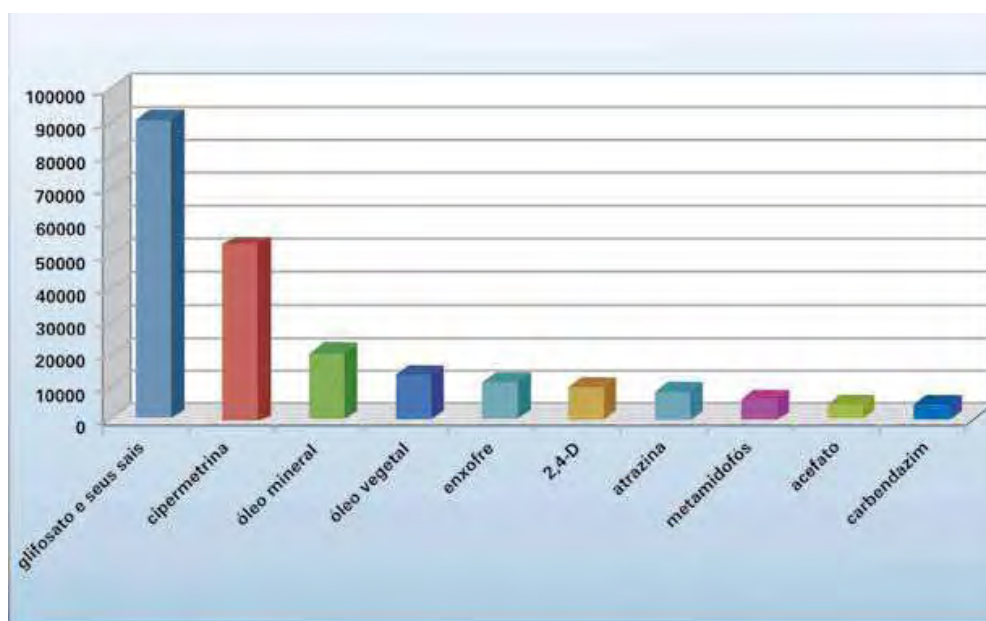
Após anos de pesquisa com essas moléculas, estudos realizados pelos pesquisadores Dr. Hamm e Dr. John Franz, mostraram que o glifosato era um herbicida potencial porque apresentava características peculiares devido à forma de metabolização deste pelas plantas. Além disso, a alta capacidade de adsorção deste à maioria dos tipos de solo prevenia sua absorção pelas plantas vizinhas. Após a aquisição dessas informações, o glifosato tornou-se uma molécula única e de interesse, principalmente no setor comercial<sup>23</sup>.

O glifosato foi sintetizado, oficialmente, pela Monsanto em 1970 e testado, preliminarmente, em casa-de-vegetação e campo, os quais apresentaram resultados bastante satisfatórios. Anos depois, o mesmo foi lançado na Malásia e Reino Unido (1974) como ingrediente ativo do herbicida Roundup<sup>®</sup> e, em seguida, nos Estados Unidos (1976).

No Brasil, o produto passou a ser comercializado em 1978 e produzido, somente, em 1984. Atualmente, existe uma variedade de formulações comerciais baseadas no glifosato, as quais hoje são cerca de 150 marcas comercializadas em mais de 120 países<sup>23,24</sup>.

## 2.2 – MERCADO NACIONAL E INTERNACIONAL

O desenvolvimento de novas tecnologias para crescente utilização do herbicida glifosato bem como sua eficácia na agricultura fizeram o Roundup<sup>®</sup> (produto original) manter-se líder mundial de venda nos últimos 37 anos<sup>23,24</sup>. Segundo Amarante Júnior *et al.*<sup>20</sup>, em seu artigo de revisão publicado em 2002, o glifosato representa cerca de 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos, contabilizando um total de US\$ 1,2 bilhão/ano com vendas do produto. Já no Brasil, a comercialização representa 76,45% do total dos ingredientes ativos, encontrando-se entre os 10 herbicidas mais comercializados (Figura 4).



**Figura 4.** Ingredientes ativos mais comercializados no Brasil em 2009.

**Fonte:** Rebelo *et al.*<sup>8</sup>

Dados recentes fornecidos pelo Ministério da Agricultura (2009) citam que o Brasil negociou mais de 80% das 725,5 mil toneladas de defensivos agrícolas tendo o glifosato como principal ingrediente ativo em suas formulações. Segundo Rebelo *et al.*<sup>8</sup>, os herbicidas a base de glifosato estão entre os defensivos agrícolas mais comercializado no Brasil (Figura 5), especialmente nas regiões centro-oeste, sudeste e sul.

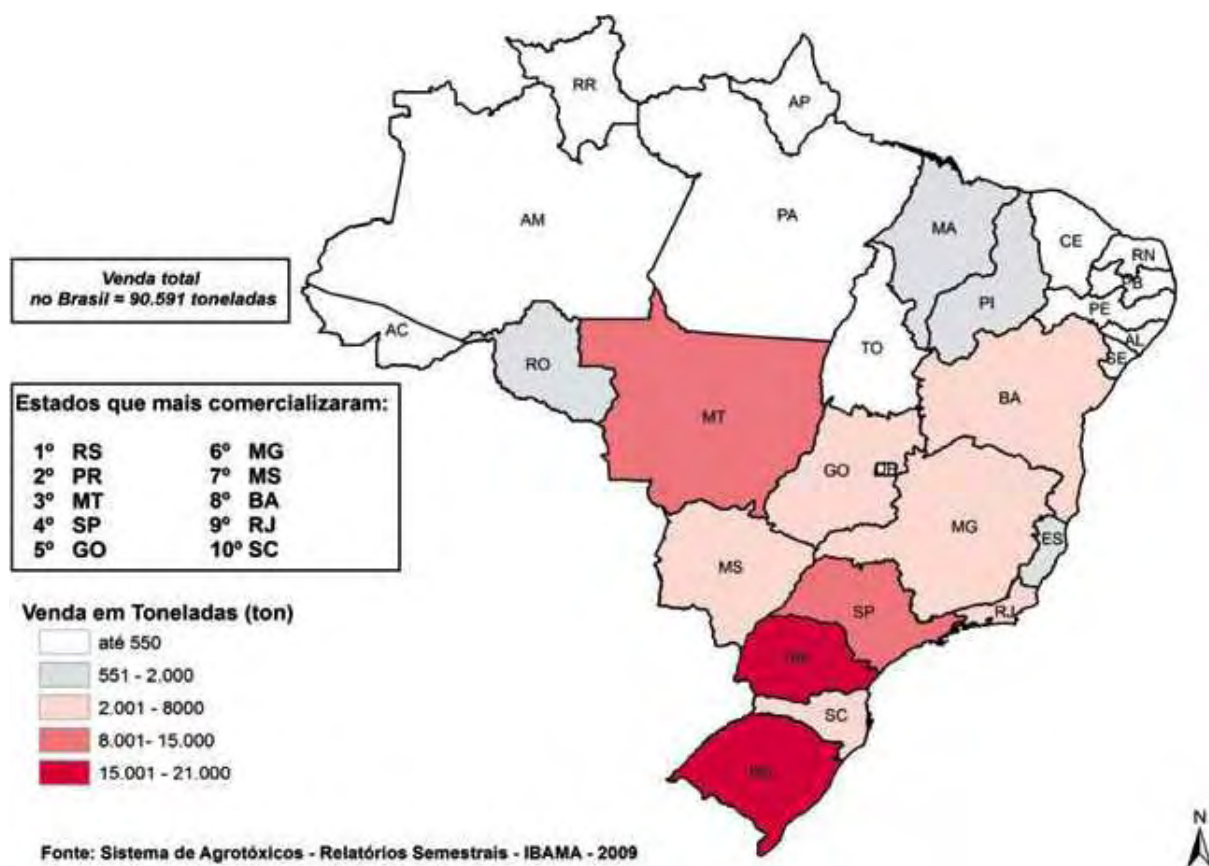


Figura 5. Mapa da comercialização de glifosato e seus sais por Estado em 2009.

Fonte: Rebelo *et al.*<sup>8</sup>

O uso expressivo deste produto na agricultura brasileira, segundo alguns produtores, é devido à evolução da soja transgênica bem como no aumento da demanda por seu principal defensivo, o glifosato<sup>25</sup>. Além disso, o Brasil apresenta vantagens como área agricultável, tecnologia e recursos humanos disponíveis para sua utilização.

### 2.3 – APLICAÇÃO DIRIGIDA

O glifosato é um herbicida pós-emergente e apresenta um amplo espectro de ação possibilitando um excelente controle das plantas daninhas. Um herbicida é considerado pós-emergente quando este é aplicado após o surgimento das plantas infestantes e antes que estas interfiram no desenvolvimento da cultura devido à competição<sup>26</sup>.

Desta forma, o glifosato pode ser aplicado de forma dirigida, ou seja, somente em parte da área agricultável. Além disso, este herbicida pode ser utilizado no controle de plantas daninhas através do plantio direto, evitando a multiplicação e disseminação de determinadas espécies de plantas detectadas e não detectadas na área<sup>24</sup>.

De acordo com Velini *et al.*<sup>23</sup>, o plantio direto teve crescimento significativo com a entrada do glifosato no mercado. Esta forma de plantio, segundo agrônomos, tem como objetivo movimentar o mínimo possível o solo ao contrário do sistema convencional. Assim, reduz consideravelmente suas perdas por erosão e conseqüentemente, permite ao solo resgatar o seu potencial produtivo devido ao manejo do solo e perda de fertilidade<sup>23,27</sup>.

Em reformas de canaviais, por exemplo, palhas remanescentes da colheita mecanizada da cana crua mantêm uma camada de cobertura morta, que contribuem para a melhoria das condições físico-químicas do solo relativas à manutenção de maiores estoques de matéria orgânica.

Vantagens do emprego da aplicação dirigida, em áreas de atividades agrícolas, é a redução dos gastos com herbicidas, uma vez que a área de cultivo será reduzida, consideravelmente, quando comparada com a aplicação em área total.

Outro emprego importante é na correção de falhas como, por exemplo, quando a aplicação do Roundup<sup>®</sup> não apresentar resultados satisfatórios às espécies de plantas daninhas presentes na região agrícola ou por tempo adequado<sup>26</sup>.

### 2.3.1 – Uso em Culturas Diversas

No Brasil, o produto comercial do glifosato é aplicado em culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citrus, côco, eucalipto, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pêra, pêssego, pinus, seringueira, soja, trigo, uva, pastagens, nas forrageiras azevém e aveia preta, dentre outros<sup>23</sup>.

### 2.3.2 – Uso no Controle de Plantas Daninhas

Embora as plantas daninhas sejam bem adaptadas às condições do solo e não são totalmente prejudiciais à cultura, o seu controle, em regiões agrícolas e não agrícolas, tornam-se necessários porque diminuem a competição com a espécie de planta de interesse por água, luz e nutrientes<sup>28</sup>.

Atualmente, aplicação de glifosato no controle de plantas daninhas presentes em áreas não agrícolas, como por exemplo, ferrovias, rodovias, linhas de transmissão de eletricidade, pátio de máquinas, dentre outros, são bastante recomendadas<sup>23</sup>.

Frequentemente, o glifosato é empregado no controle químico de plantas daninhas anuais e perenes, monocotiledôneas ou dicotiledôneas<sup>20</sup>. No entanto, a eficiência na aplicação do produto está diretamente relacionada com a dosagem recomendada, em função das espécies mais tolerantes presentes na região de cultivo.

### 2.3.3 – Uso no Controle de Plantas Aquáticas

Os ambientes aquáticos, de forma geral, são formados por uma grande biodiversidade vegetal, que em situações ecologicamente equilibradas, é essencial para a manutenção e desenvolvimento deste sistema.

Embora a ampla utilização do glifosato seja em vários tipos de culturas, este herbicida também é registrado, em vários países, no controle de plantas aquáticas (emersas e flutuantes ou submersas)<sup>23</sup>, na resolução de problemas causados por plantas, tais como, interrupção de fluxo de água, desobstrução de tomadas de água e impedimento à pesca e navegação.

Para este uso específico, a formulação comercial não contém surfactante, pois a presença desta substância em água é proibida devido ao seu grau de toxicidade. Contém penas glifosato em sua forma ácida ( $480 \text{ g L}^{-1}$ ) ou na forma de sal ( $648 \text{ g L}^{-1}$ ) e ingredientes inertes, o qual é absorvido pelas folhas e partes verdes dos ramos e distribuído por toda planta<sup>20</sup>.

De acordo com Velini *et al.*<sup>23</sup>, o glifosato não controla plantas aquáticas submersas, provavelmente devido a baixa biodisponibilidade em águas naturais, decorrentes de sua fotodegradação e rápida decomposição microbiana.

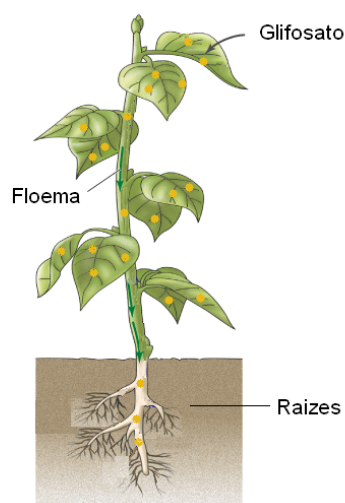
## 2.4 – MODO DE APLICAÇÃO

Segundo Williams, Kroes e Munro<sup>29</sup> a principal composição das amostras de herbicida Roundup<sup>®</sup> é o glifosato em sua forma ácida e surfactante, em geral, o polietoxietileno amina (POEA), o qual é constituído de polioxietileno de alquilaminas de cadeias longas, sendo este obtido a partir da síntese de ácidos graxos de origem animal.

Estes pesquisadores citam que a presença do surfactante é de grande importância, uma vez que garante a eficiência da aplicação deste nas culturas, por possibilitar melhor aderência nas folhas e com isso maior permanência no tecido vegetal.

Em geral, o produto comercial do glifosato, é aplicado na forma pulverizada, sendo absorvido fortemente pelas plantas, através de folhas e caulículos novos. Uma vez no interior da planta, o glifosato é translocado via floema para os tecidos meristemáticos, o primeiro sítio de ação do herbicida e transportados para os tecidos alvos, tais como raízes e rizomas<sup>20</sup> (Figura 6).

De acordo com Velini *et al.*<sup>23</sup>, para um herbicida de aplicação foliar, a presença de surfactantes na composição do produto comercial, facilita a absorção e transporte através da barreira de cera da cutícula foliar.



**Figura 6.** Transporte do glifosato via floema, em plantas daninhas.

**Fonte:** Imagem adaptada<sup>30</sup>.

A disponibilidade do glifosato e do surfactante, para permear a área de contato no tecido vegetal, está diretamente relacionada com o volume da gota e a concentração do herbicida. No entanto, esta pode ser alterada pelos surfactantes presentes nas formulações.

Segundo Velini *et al.*<sup>23</sup>, a escolha do surfactante, usado nas formulações comerciais, merece especial atenção, por facilitar o movimento do glifosato pelas paredes celulares bem como a penetração na cutícula, as quais são provenientes de alguns fatores:

- Aumento da cobertura de pulverização na superfície foliar, através da redução da tensão superficial entre a superfície cerosa da folha;
- Facilidade de remoção do ar entre a gota e a cutícula da folha;
- Promover um bom contato.



## 2.5 – MECANISMO DE AÇÃO

Devido à aderência do produto comercial, a degradação da planta ocorre lentamente, em poucos dias ou semanas, pela inibição da síntese da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostato (EPSP), a qual é responsável pela biossíntese do corismato. Esta enzima é a única substância que pode impedir o modo de ação do glifosato em doses ou concentrações que viabilizem o seu uso comercial como herbicida<sup>25</sup>.

Embora o glifosato apresente amplo espectro de ação e seu uso seja bastante difundido, as informações sobre seu modo de ação não foram completamente elucidadas. No entanto, a literatura<sup>20,23</sup> cita que a rota biossintética (rota do chiquimato), inibida pela enzima EPSP, tem a função de produzir aminoácidos aromáticos, tais como fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais são precursores de outros produtos que são essenciais para a sobrevivência da planta, destacando-se os taninos condensados, antocianinas, vitamina E, ácido indolacético (AIA), ácido salicílico, lignina, flavonas, isoflavonas, fenilpropanóides, e cumarinas.

A Figura 7 descreve detalhadamente o mecanismo de ação do glifosato na síntese dos aminoácidos pela competição da enzima enolpiruvilchiquimato fosfato.



Figura 7. Mecanismo de ação do glifosato em plantas.

Fonte: Velini et al.<sup>23</sup>

Conforme o esquema apresentado na Figura 7, o glifosato é um inibidor específico da conversão de chiquimato a corismato, o que leva à redução na biossíntese de fenilalanina e, conseqüentemente, de fitoalexinas, os quais são fundamentais para a continuidade da síntese protéica nas plantas.

De acordo com Williams, Kroes e Munro<sup>29</sup>, esta rota biossintética dos aminoácidos ácidos ocorre em plantas e em alguns microrganismos (fungos e bactérias)<sup>23</sup>. Embora a rota do chiquimato ocorra exclusivamente em plantas e algumas espécies de microrganismos, segundo Velini *et al.*<sup>23</sup>, não está claro como esses eventos ocorrem e se os sistemas de controle são similares a várias espécies de plantas.

## 2.6 – PLANTAS RESISTENTES AO USO DO GLIFOSATO

O glifosato foi o principal responsável pela introdução de culturas geneticamente modificadas, especialmente em culturas de soja, milho, canola e algodão, uma vez que promove resistência destas plantas no ambiente e, conseqüentemente, melhor eficiência na produção<sup>23</sup>.

Embora o tema tenha se tornado popular com o cultivo de lavouras experimentais, modificações genéticas foram iniciadas por volta de 1995, quando testes empregando bactérias apresentaram alterações nos genes de microrganismos<sup>31</sup>.

Organismos geneticamente modificados (OGMs) ou transgênicos podem ser plantas, animais ou microrganismos que tiveram no seu material genético a introdução de DNA proveniente de outro organismo. Em alguns casos, esse organismo pode ser outro indivíduo da mesma espécie, ou o mais comum, de outra espécie com o qual não há cruzamento natural<sup>32</sup>.

Culturas transgênicas de fumo, tomate, algodão, linho e batata, resistentes ao herbicida glifosato, foram obtidas pela introdução de uma enzima insensível ao herbicida, sendo esta obtida pela mutagênese a partir de uma enzima EPSPs endógena de milho. Já a soja resistente ao herbicida glifosato foi obtida pela introdução no genoma da planta do gene que codifica a EPSPs, isolado da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* estirpe CP4, a qual é capaz de metabolizar o glifosato, tornando a planta imune aos efeitos destrutivos e letais desse herbicida, mesmo quando a enzima nativa é inibida pela ação do glifosato<sup>20,23</sup>.

De acordo com Velini *et al.*<sup>23</sup>, com o surgimento de culturas resistentes a esse produto e o uso prolongado em uma mesma área de aplicação tem aumentado o aparecimento de plantas daninhas tolerantes e resistentes, dentre as quais podemos citar as espécies: caruru (*Amaranthus palmeri*), losna (*Ambrósia artemisifolia*), buva (*Conyza bonariensis*), pé-de-galinha (*Eleusine indica*), azevém (*Lolium multiflorum*), capim-amargoso (*Digitaria insulares*), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*).

Segundo os ambientalistas<sup>31</sup>, a principal preocupação com o cultivo de alimentos transgênicos é o desequilíbrio ecológico, pela perda de controle desses alimentos devido à inserção natural desses genes em outras plantas.

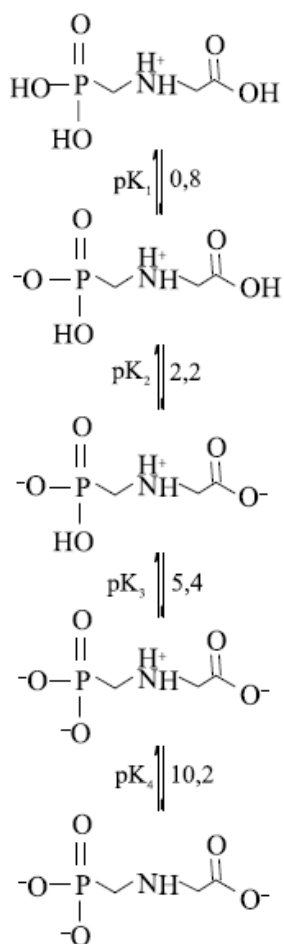
Estes autores<sup>31</sup> citam também que isso pode acontecer, porque as plantas geneticamente modificadas podem fazer uma polinização cruzada com espécies semelhantes e, deste modo, contaminar plantas utilizadas exclusivamente na alimentação e promover danos irreparáveis, já que seus efeitos a médio e a longo prazo, tanto no meio ambiente quanto no organismo humano, são totalmente desconhecidos.

## 2.7 – DINÂMICA DO GLIFOSATO NO MEIO AMBIENTE

Além da eficiência no processo de remoção de plantas indesejadas, o glifosato é considerado por pesquisadores um herbicida ideal por apresentar toxicidade baixa aos que o manipulam e ao meio ambiente. No entanto, em concentrações consideráveis como em efluentes de fábricas produtoras, pode representar riscos a ambientes agrícolas e aquáticos<sup>33</sup>.

Embora não seja considerado um sério contaminante, devido à baixa mobilidade no ambiente, o controle e monitoramento do glifosato são muito importantes, já que o mesmo apresenta forte retenção pelos colóides do solo e alta solubilidade em água.

Outro fator importante é a presença de um grupo aminoácido fosfonado à molécula de glifosato, proporcionando um caráter hidrofílico e comportamento zwitteriônico<sup>23</sup>, ou seja, pode ter capacidade de troca aniônica e de troca catiônica. Na literatura<sup>20,23</sup>, são encontradas os valores das constantes de dissociação do glifosato ( $pK_1 = 0,8$ ;  $pK_2 = 2,16$ ;  $pK_3 = 5,46$ ;  $pK_4 = 10,14$ ), em função do comportamento zwitteriônico, os quais fornecem informações sobre o grau de dissociação do herbicida em função do pH (Figura 8).



**Figura 8.** Dissociação do glifosato.

**Fonte:** Amarante Júnior *et al.*<sup>20</sup>

### 2.7.1 – Contaminação de Águas Naturais

A contaminação de águas superficiais e subterrâneas por resíduos de agrotóxicos gera grande preocupação, uma vez que a água pode receber compostos orgânicos tóxicos, prejudicando não só as espécies aquáticas, mas também o homem e causar sérios riscos à saúde humana e ao ambiente.

Atualmente, existem diferentes fontes de contaminação, dentre as quais podemos destacar<sup>12</sup>:

- Exoderiva, proveniente de pulverizações aéreas ou terrestres;
- Lixiviação, através da água no solo e erosão;
- Descarte de embalagens comerciais;
- Limpeza de tanques de pulverização contaminados.

De acordo com Baird<sup>1</sup>, em regiões urbanas, a maior fonte de contaminação de água, são os descartes inadequados de lixos municipais e industriais. Por isso, elevados teores de compostos orgânicos tóxicos são, comumente, encontrados em locais onde esses produtos foram fabricados e/ou acumulados pelos seus descartes.

Segundo Struger e Thompson<sup>34</sup>, embora ainda não se conheça os riscos do glifosato à saúde humana e meio ambiente, este foi previamente classificado para anfíbios como um herbicida moderadamente tóxico. Recentemente, pesquisas sugerem que o mesmo possa ser potencialmente tóxico para algumas espécies de anfíbios nativos.

No Brasil, a resolução do CONAMA nº 357 estabelece limites máximo para a concentração de glifosato de 65 mg L<sup>-1</sup> para águas doces de classes I e II e de 280 mg L<sup>-1</sup> para águas de classe III. Para fins de enquadramento de classificação de corpos e de condições e padrões de qualidade das águas, o Ministério da Saúde (Portaria 1.469/200)<sup>23,35</sup> tem uma resolução que define o valor máximo permitido de glifosato de 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

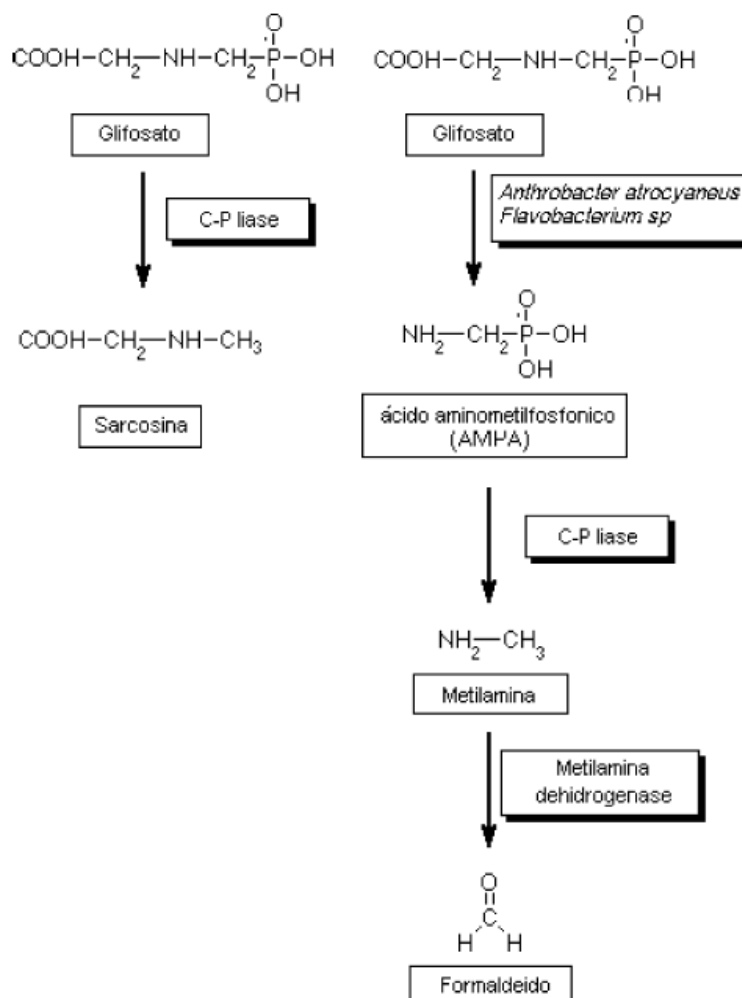
### 2.7.2 – Comportamento do Glifosato em Solos

Quando o glifosato é aplicado, parte do produto é diretamente absorvido, ficando nas plantas daninhas, e parte é encaminhado para o solo. Quando presente nos tecidos vegetais, este contribui para reduzir sua disponibilidade no ambiente.

No entanto, quando parte do herbicida não atinge o organismo alvo de controle, este é depositado no solo, a partir do qual ocorrem processos que determinam seu destino.

Dentre os principais processos estão: a formação de complexos em água com íons metálicos  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , sorção em sedimentos ou partículas suspensas em água e solo, absorção e metabolismo por plantas e biodegradação por microrganismos<sup>23</sup>.

A degradação do glifosato no solo é realizada por uma variedade de microrganismos, que usam este composto como fonte de energia. Conforme apresentado na Figura 9, a degradação pode seguir duas rotas<sup>20</sup>: 1) transformando o glifosato em sarcosina por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase). Nesta rota, a sarcosina entra no metabolismo destes microrganismos e de outros, degradando-se. 2) transformando o glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA).



**Figura 9.** Rotas de decomposição do glifosato.

## 2.8 – EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO GLIFOSATO

Segundo Velini *et al.*<sup>23</sup>, o glifosato possui um coeficiente de partição octanol/água muito baixo ( $K_{ow} = 0,00033$ ), indicando baixa mobilidade e consequentemente baixa tendência a bioacumulação.

Embora, no solo, o glifosato livre seja rapidamente biodegradado à AMPA e sarcosina, por microrganismos, o glifosato adsorvido é degradado lentamente. Além disso, a presença de glifosato em ambientes aquáticos pode ser um fator preocupante, quando este apresenta elevadas temperaturas e baixos valores de pH<sup>20</sup>, como por exemplo em águas pretas.

Desta forma, o uso intensivo, deste herbicida, em regiões agrícolas e não-agrícolas pode causar significativos impactos ambientais<sup>36</sup>, devido à destruição natural de algumas espécies de plantas e/ou animais bem como redução da fonte de alimentos para algumas espécies já existentes.

Apesar de ainda não se conhecer os reais efeitos deste composto no organismo de seres humanos e em animais, há relatos que seu uso prolongado pode provocar efeitos deletérios no ambiente, principalmente devido à resistência adquiridas por algumas espécies de plantas<sup>37</sup>. Além disso, segundo a literatura<sup>38</sup>, alguns ensaios realizados em animais (*in vivo* e *in vitro*) revelaram efeitos teratogênico, mutagênico e carcinogênico em algumas espécies de animais.

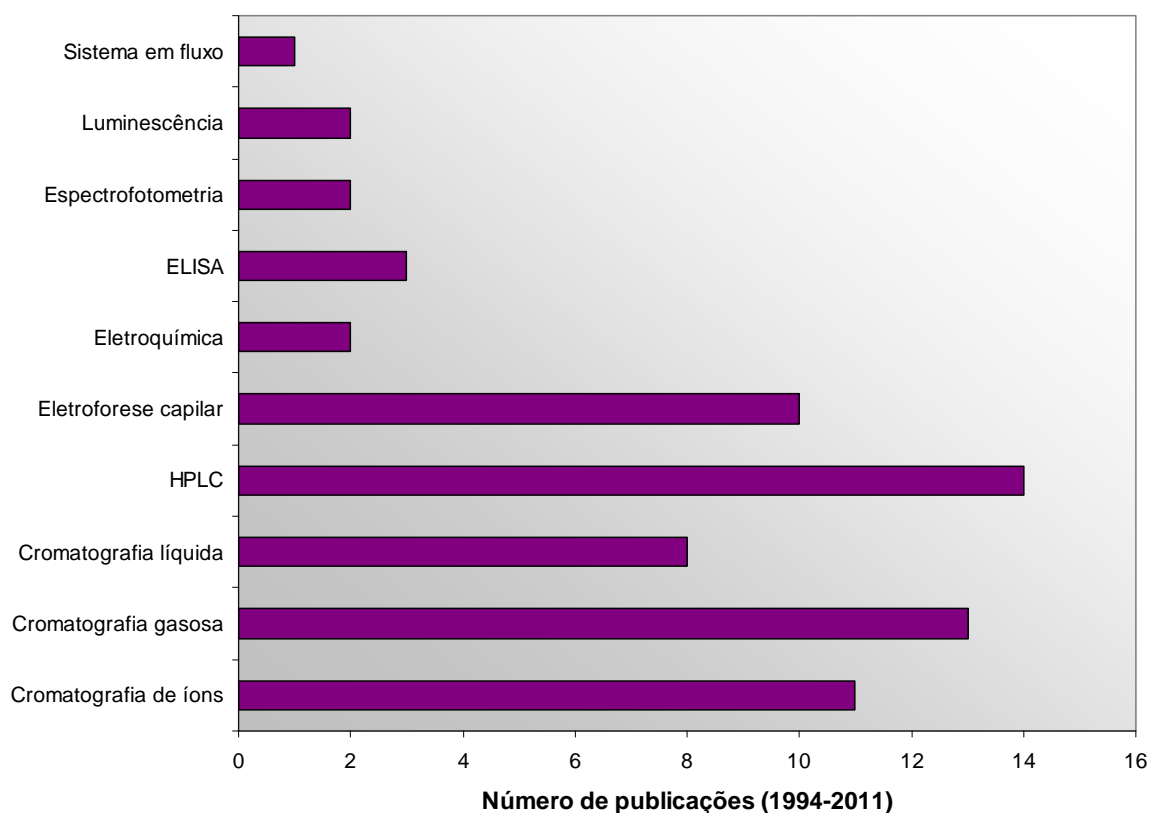
Em seres humanos, os efeitos causados pelos herbicidas comerciais são: dermatite de contato e síndrome tóxica após a ingestão de doses elevadas (epigastralgia, ulceração ou lesão de mucosa gástrica, hipertermia, anúria, oligúria, hipotensão, conjuntivite, edema orbital, choque cardiogênico, arritmias cardíacas, edema pulmonar não-carcinogênico, pneumonite, necrose tubular aguda, elevação de enzimas hepáticas, aumento da quantidade de leucócitos, acidose metabólica e hipercalemia).

De acordo com alguns pesquisadores, esses efeitos não estão relacionados à molécula glifosato, mas proveniente do uso de surfactante presente nas formulações comerciais de herbicidas<sup>12, 20, 39</sup>.



### 3 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Levantamento bibliográfico realizado na base de dados do SciFinder, no período de 1994 a 2011 dos principais métodos de análise de glifosato em diferente tipos de matrizes (Figura 10), verifica-se a cromatografia é uma das técnicas de análise mais comumente empregada para a determinação de glifosato, devido à alta sensibilidade e seletividade.



**Figura 10.** Distribuição das publicações de glifosato de acordo com os métodos de análise utilizado.

Conforme apresentado na Figura 10, dentre os métodos cromatográficos empregados para a determinação de glifosato, pesquisas recentes mostram que a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC) são as mais utilizadas devido aos resultados bastante satisfatórios, uma vez que o caráter zwitteriônico da molécula permite uma boa separação do analito.

### 3.1 – MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Dentre as metodologias propostas para determinação de glifosato, os métodos cromatográficos são os mais frequentemente empregados por apresentar boa seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade<sup>40</sup>. No entanto, a ausência de grupos cromóforos (Anexo 1) ou fluoróforos em sua estrutura, dificulta a quantificação deste analito, sendo, portanto, necessária a aplicação de técnicas de derivatizações que podem ser pré ou pós-coluna, especialmente, quando se utiliza detecção por fluorescência<sup>41</sup>.

Em geral, as técnicas de derivatização requerem várias etapas para promover melhor resolução e seletividade do método. Entretanto, desvantagens como longo tempo de extração e análise, baixa reprodutibilidade, emprego de solventes tóxicos e formação de produtos instáveis, são descritas na literatura<sup>41,42</sup>.

Os agentes derivatizantes são compostos que reagem com o analito de interesse e possibilitam a conversão a um composto estável. Dentre os agentes derivatizantes empregados em análise cromatográfica para determinação do glifosato, os mais utilizados são: *o*-fitalaldeído (OPA), *o*-fitalaldeído-mercaptoetanol (OPA-MERC), naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA), 9-fluorenil-metiloxycarbonil cloroformato (FMOC-Cl), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno<sup>40,43</sup>. Segundo Xiao *et al.*<sup>43</sup>, atualmente, poucas pesquisas são registradas na literatura sem a utilização da etapa de derivatização.

#### 3.1.1 – Cromatografia Gasosa (GC)

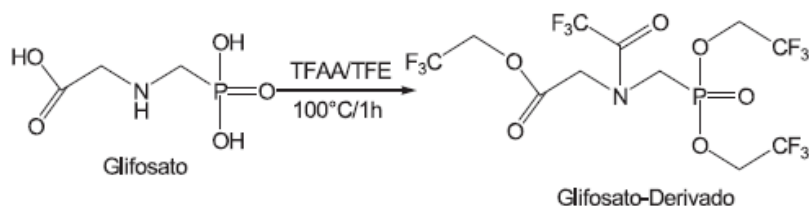
Pesquisa realizada por Struger *et al.*<sup>34</sup>, resíduos de glifosato e seu principal metabólito (AMPA), em amostras de água superficiais, foram quantificados empregando cromatografia gasosa, por meio de padronização interna e derivatização pré-coluna. Os valores de concentração de glifosato e AMPA foram obtidos a partir de cálculos das áreas dos respectivos picos em comparação com o sinal padrão. Dentre as amostras coletadas e analisadas no período de 2004, aproximadamente 5%, apresentaram teores de glifosato acima do limite de quantificação e 21% acima do limite de detecção.

A cromatografia gasosa pode ser acoplada a vários tipos de detectores dentre os quais podemos destacar os detectores por ionização de chama, captura de elétrons, espectrômetro de massas, por apresentar alta sensibilidade.

Kataoka *et al.*<sup>44</sup> desenvolveram um método analítico para determinação simultânea de fósforo proveniente do glifosato, AMPA e glufosinato em amostras ambientais e alimentícias. Esses compostos foram convertidos em derivados de N-isopropoxicarbonil metil éster e as medidas foram feitas empregando cromatografia gasosa usando uma coluna capilar (DB-1701) com detecção por ionização de chama. Todas as medidas foram realizadas em 20 minutos, com resultados bastante satisfatórios, devido à eficiência na volatilização e estabilidade dos produtos formados.

Um método de determinação de resíduo de glifosato e AMPA em águas, solos, plantas e produtos de origem animal, foi proposto por Alferness e colaborador<sup>45</sup>. Neste trabalho, os analitos de interesse das amostras de plantas e águas foram extraídos do solo usando a mistura de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e as amostras de origem animal foram extraídos com  $\text{HCl}$  ( $0,1 \text{ N}$ ) ou  $\text{HAc}$  ( $0,6 \%$ ). Após a extração, as amostras de plantas e de origem animal foram passadas em uma coluna de troca catiônica. As amostras de água, extratos de solo e os extratos, purificados das amostras de plantas e dos produtos de origem animal, foram derivatizados empregando a mistura de heptafluorobutanol e trifluoroacético. As análises foram feitas por meio de cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massa através do monitoramento do íon selecionado.

Abreu *et al.*<sup>37</sup>, em trabalho publicado em 2008, também propôs o desenvolvimento de método de análise para a determinação de glifosato em grãos de soja empregando cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Neste trabalho, foi feito um pré-tratamento da fase aquosa dos extratos das amostras, através da partição líquido-líquido e extração em fase sólida com resina de troca aniônica, após a derivatização com a mistura de ácido trifluoroacético anidro (TFAA) e 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). A Figura 11 apresenta a etapa de derivatização do glifosato.



**Figura 11.** Esquema de conversão do glifosato em seu respectivo derivado.

Fonte: Abreu *et al.*<sup>37</sup>

Royer *et al.*<sup>46</sup> proporam o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de glifosato e AMPA em amostras de água de diferente grau de dureza (5, 20 e 30 °D) e plantas. Para a aplicação do método, as amostras foram fortificadas nas seguintes concentrações de solução padrão de glifosato: 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O preparo das soluções de trabalho foi feito a partir da fortificação das amostras e purificação utilizando extração em fase sólida por meio de uma coluna cromatográfica de resina de troca iônica e derivatização, empregando a mistura de ácido trifluoroacético anidro e 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol. Estas foram analisadas por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa e padronização externa.

De acordo com os autores, as condições experimentais por MS/MS foram otimizadas, para os analitos estudados (glifosato e AMPA), e a quantificação de ambos foi obtida pela área dos três picos majoritários, m/z 440, 321, e 261 para glifosato e m/z 283, 223 e 181 para AMPA. Os resultados obtidos na determinação de glifosato em amostras de água de diferente grau de dureza e plantas apresentaram bons resultados nos níveis de fortificação estabelecidos.

A Tabela 1 apresenta a comparação de alguns métodos propostos na literatura, para a determinação de glifosato, empregando a cromatografia gasosa.

**Tabela 1.** Características de alguns trabalhos, descritos na literatura, empregando cromatografia gasosa.

Matriz	Tipo de detector	Faixa linear	Limite de detecção	Referências
Águas superficiais	Nitrogênio/Fósforo	17-40,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	34
Águas de rio, solo e cenoura	Ionização de chama	5-200 ng	12 pg	44
Solo, planta e de origem agrícola e animal	Espectrômetro de massa	0,1-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,1 pg $\mu\text{L}^{-1}$	45
Águas mineralizadas e plantas	Espectrômetro de massa	0,0025-0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,025 $\mu\text{g L}^{-1}$	46
Grãos de soja	Espectrômetro de massa	200-1000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	60 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	37
Solo	Nitrogênio/Fósforo	0,1-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	9 x 10 <sup>-12</sup> g	47
Águas de consumo e águas naturais	Espectrômetro de massa	0,09-35 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,32 $\mu\text{g L}^{-1}$	48
		0,15-180 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,36 $\mu\text{g L}^{-1}$	49

### 3.1.2 – Cromatografia de Íons (IC)

A cromatografia de íons é bastante aplicada na separação e quantificação de ânions empregando soluções aquosas de hidróxidos, carbonatos, por exemplo, como eluente em um sistema de coluna de troca aniônica acoplada a uma coluna supressora. O caráter zwitteriônico da molécula permite que medidas por condutividade apresentem alta sensibilidade bem como seletividade<sup>50</sup>.

Zhu *et al.*<sup>51</sup>, propuseram um método rápido, seguro, simples e barato para a determinação de glifosato em amostras de águas e produtos agrícolas. Medidas das amostras foram feitas por cromatografia de íons e detecção por condutividade (DX-100) empregando eluente contendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9 mmol L<sup>-1</sup>) e NaOH (4 mmol L<sup>-1</sup>).

Este procedimento de análise, também foi utilizado por Sánchez *et al.*<sup>52</sup>, na determinação de glifosato em amostras de águas de rio Catatumbo, localizado na Venezuela, e seus efluentes, coletadas em diferentes locais e época do ano. Segundo esses autores<sup>52</sup>, os compostos não ionizáveis ou fracamente ionizáveis, com pKa maior que 7,0, não interferem nos resultados devido à baixa condutividade fornecida ao sistema. Também, concluíram que os íons interferentes, tais como os ânions de cloreto, fosfato, nitrato, nitrito, sulfato, não apresentam influencia significativa no sinal analítico porque estes possuem baixo tempo de retenção.

Zhang *et al.*<sup>53</sup> e Zhang e Wu<sup>54</sup> e em trabalhos publicados em 2003 e 2010, para análise de glifosato em amostras de solos e águas de consumo humano, respectivamente, também utilizou cromatografia de íons, acoplado a detecção por condutância.

Mallat *et al.*<sup>55</sup>, determinaram traços de glifosato e AMPA em amostras de águas naturais empregando cromatografia de íons com derivatização pós-coluna e detecção por fluorescência. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método de análise para determinar glifosato e AMPA, usando a pré-concentração e isolamento desses compostos em matriz ambientais bem como estudar o comportamento da degradação do glifosato, sob diferentes condições ambientais. O método analítico proposto foi desenvolvido e aplicado em amostras de água, após a pré-concentração, empregando cartuchos com resinas poliméricas e empregando coluna de troca aniônica. Neste estudo, os autores observaram que a degradação do glifosato, nas amostras ensaiadas, de acordo com as condições de trabalho, foi mais significativa em relação ao AMPA.

Tabela 2 apresenta a comparação de alguns métodos propostos na literatura, para a determinação de glifosato, empregando a cromatografia de íons com detecção por condutividade e fluorescência.

**Tabela 2.** Características de alguns trabalhos, descritos na literatura, empregando cromatografia de íons.

Matriz	Tipo de detector	Faixa linear	Limite de detecção	Referências
Águas naturais	Condutividade	0,042-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,042 $\mu\text{g mL}^{-1}$	51
Águas de rios	Condutividade	2-50 $\text{mg L}^{-1}$	62 $\mu\text{g L}^{-1}$	52
Águas naturais	Fluorescência	5-200 $\mu\text{g L}^{-1}$	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	55
Águas naturais e águas de consumo humano	Condutividade	0,05-0,75 $\text{mg L}^{-1}$	< 0,5 $\text{mg L}^{-1}$	56

### 3.1.3 – Cromatografia Líquida (LC)

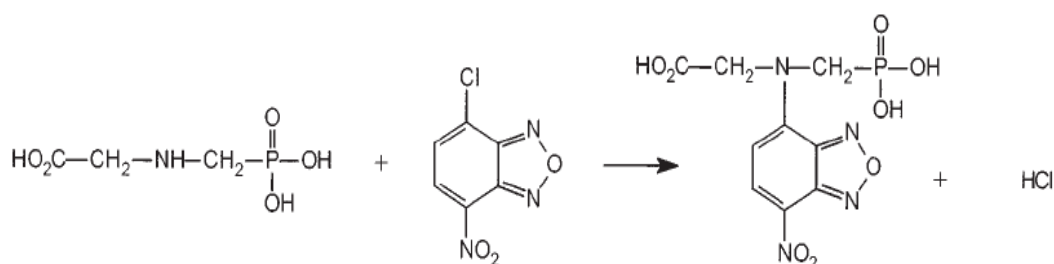
Hidalgo *et al.*<sup>57</sup> determinaram glifosato e AMPA, em diferentes tipos de amostra de água. As medidas analíticas foram baseadas na derivatização pré-coluna e injeção de um volume em uma coluna de cromatografia líquida usando detecção por fluorescência (LC–LC–FD). Para a aplicação deste método de análise, as amostras de águas de consumo humano e naturais foram pré-concentradas, por meio de uma coluna de troca iônica (Amberlite® IRA-900) e derivatizadas, empregando solução tampão de borato (pH 9) e 9-fluorenilmetilcloroformate (FMOC).

Neste trabalho<sup>57</sup>, as amostras analisadas foram passadas em duas colunas de extração, na qual inicialmente, alíquotas de 2 mL das amostras foram colocadas em uma coluna C<sub>18</sub>, de 3 cm. De acordo com os autores, a inserção desta etapa de extração no procedimento experimental proporcionou uma eficiente separação entre o glifosato derivado e o excesso de (FMOC). Em seguida, o glifosato derivatizado foi passado em uma coluna de troca aniônica (25 cm) para a separação deste e analisados. Os resultados obtidos empregando este procedimento cromatográfico foram bastante satisfatórios.

Morlier e colaboradores<sup>58</sup> desenvolveram um método empregando cromatografia líquida, com detecção UV (195 nm) para a determinação de glifosato em várias formulações comerciais. Para a determinação analítica, 50  $\mu\text{L}$  das amostras foram injetadas, diretamente, no cromatógrafo líquido acoplado a uma coluna SAX (25 cm) e fase móvel,

preparada a partir da mistura de 96 % de solução tampão de fosfato ( $0,0062 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 4 % de metanol. As injeções das amostras no sistema foram feitas via alça tubular (ou *loop*) de volume fixo. A quantificação do glifosato nas amostras foi feita a partir dos cálculos das áreas dos picos destas e comparações com os valores das áreas obtidos por padronização externa.

Em trabalho desenvolvido por Colin *et al.*<sup>59</sup>, o glifosato e o AMPA foram determinados simultaneamente em amostras de água. Neste método a derivatização foi realizada *in situ* com 4-cloro-7-nitrobenzoxadiazol (NBD-Cl) à  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 12). A quantificação foi realizada por cromatografia líquida com detecção por fluorescência após a separação do grupo amino pela coluna.



**Figura 12.** Substituição nucleofílica do glifosato com NBD-Cl.

**Fonte:** Colin *et al.*<sup>59</sup>

Para a obtenção do derivado glifosato-NBD (Figura 12), o tempo de eluição foi otimizado para aplicação deste método no local de coletas. Durante esta etapa, a concentração da solução padrão do derivado de glifosato, em água, obtido foi de  $136 \mu\text{g L}^{-1}$ , a qual corresponde a  $69,2 \mu\text{g L}^{-1}$  de concentração de glifosato.

Tabela 3 apresenta a comparação de alguns métodos propostos na literatura, para a determinação de glifosato, empregando a cromatografia líquida.



**Tabela 3.** Características de alguns trabalhos, descritos na literatura, empregando cromatografia líquida.

Matriz	Tipo de detector	Faixa linear	Limite de detecção	Referências
Águas naturais	Fluorescência	0,1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	57
Herbicidas comerciais (forma sólida)	UV	0,2-0,4 %	-	58
Águas naturais	Espectrômetro de massa	0,5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,2 $\text{ng L}^{-1}$	60
Águas naturais	Espectrômetro de massa	-	5 $\text{ng L}^{-1}$	61
Águas naturais	Fluorescência	0,1-2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$	62

### 3.1.4 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Nedelkoska e Low<sup>63</sup>, em trabalho publicado em 2004, descrevem a aplicação de HPLC para determinação de glifosato e AMPA por fluorescência, em águas e plantas após derivatização pré-coluna utilizando 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl).

Neste trabalho tanto a reação de derivatização quanto a utilização de HPLC foram otimizadas. De acordo com os autores deste estudo, as melhores condições de trabalho, na etapa de separação do glifosato e AMPA, em amostras de água, foram empregando uma coluna polimérica e fase móvel a pH 10, preparada com 55 % de acetonitrila e tampão de fosfato (50  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Para as amostras de plantas, a separação do glifosato da matriz em HPLC foi passando a solução de análise por duas colunas poliméricas acopladas em uma válvula comutadora.

Peruzzo, Porta e Ronco<sup>64</sup> também determinaram resíduos de glifosato em amostras de água, solo e sedimentos provenientes de áreas de cultivos de sojas transgênicas por HPLC e detecção UV (206 nm). Neste trabalho, o agente derivatizante utilizado foi o mesmo empregado por Nedelkoska e Low<sup>63</sup> (FMOC-Cl).

Procedimento envolvendo a aplicação de HPLC, também foi utilizado por Abdullah e colaboradores<sup>65</sup>. Estes autores propuseram a determinação de glifosato e AMPA, com ênfase no preparo de amostras. As amostras utilizadas foram águas naturais sendo preparadas a partir da extração com diclorometano e pré-concentradas em evaporador

rotatório. Os extratos foram passados em cartucho de troca aniônica (SAX) com a adição de aproximadamente 2 mL de resina na forma básica. Os analitos de interesse foram eluidos com tampão de citrato (pH) e submetido as análises cromatográficas.

Qian *et al.*<sup>66</sup> desenvolveu uma derivatização pré-coluna para a determinação de glifosato por HPLC. A derivatização foi realizada com 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto (CNBF) à temperatura de 60 °C, por um período de 30 minutos, em meio de tampão de borato (pH 9,5). A separação do glifosato foi feita empregando uma coluna C<sub>18</sub> e as medidas realizadas por detecção UV (360 nm), por um tempo de retenção de aproximadamente 15 minutos. De acordo com os autores<sup>66</sup>, o tempo de análise dos compostos de glifosato e AMPA bem como a formação dos respectivos derivados foram bastante satisfatório quando comparadas com outros tipos de derivatização, devido ao menor tempo de análise e maior estabilidade do produto formado.

Vreeken *et al.*<sup>67</sup> desenvolveram um método automatizado para a determinação de glifosato e AMPA, na faixa de concentração de 0,05 mg L<sup>-1</sup> a 3,0 mg L<sup>-1</sup>, em diferentes tipos de água. O método desenvolvido consistiu na utilização de extração em fase sólida (*online*) em HPLC com detecção por espectrômetro de massas e ionização por electrospray (SPE-HPLC-ESI-MS-MS).

A derivatização do glifosato e AMPA foi feito diretamente nas amostras de água selecionadas, com fluorenil-9-metoxicarbonil (FMOC), seguido de pré-concentração por SPE e separação por HPLC. A identificação e quantificação foram feitas por meio de uma razão de três picos selecionados de cada um dos analitos estudado (íon precursor e dois íons do composto derivado) juntamente com o tempo de retenção para comprovar a seletividade e confiabilidade do procedimento.

Le Bot *et al.*<sup>68</sup>, também proporam um método análise baseado em HPLC com detecção por fluorescência, empregando 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl) como reagente derivatizante. Neste estudo, os objetivos foram otimizar e validar o método proposto, para a determinação de glifosato e AMPA em águas naturais e águas de consumo humano, para avaliar a qualidade das amostras de água em relação à presença desses compostos.

De acordo com os autores deste estudo<sup>68</sup>, os produtos derivatizados foram injetados diretamente no cromatógrafo e separados em uma coluna de sílica gel, funcionalizada com grupos aminas. Os resultados obtidos com a determinação dos parâmetros de validação estudados, como limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e desvio

padrão relativo, mostraram que o método desenvolvido é bastante adequado para análise de glifosato e AMPA em níveis traços.

De acordo com Ibañez *et al.*<sup>61</sup> e *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC International)<sup>69</sup>, o método oficial descrito na literatura, para determinação de glifosato em formulações comerciais é empregando HPLC com detecção espectrofotométrica (UV) e quantificação por padronização externa. Já para a determinação de resíduos de glifosato em amostras de águas naturais e destinadas ao consumo humano, recomenda-se HPLC com detecção por fluorescência com derivatização pós-coluna.

Tabela 4 apresenta a comparação de alguns métodos propostos na literatura, para a determinação de glifosato, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência.

**Tabela 4.** Características de alguns trabalhos, descritos na literatura, empregando cromatografia líquida de alta eficiência.

Matriz	Tipo de detector	Faixa linear	Limite de detecção	Referências
Águas e plantas	Fluorescência	-	0,16 µg L <sup>-1</sup>	63
Águas, Solos e sedimentos	UV	-	0,04 mg L <sup>-1</sup> 0,10 mg L <sup>-1</sup>	64
Águas naturais	Fluorescência	0,025-1,0 µg L <sup>-1</sup>	-	65
Águas naturais	UV	0,3-48,5 mg L <sup>-1</sup>	0,009 mg L <sup>-1</sup>	66
Águas residuais e águas de consumo	Espectrômetro de massa	0,05-3,0 µg L <sup>-1</sup>	0,03 µg L <sup>-1</sup>	67
Águas naturais e águas de consumo	Fluorescência	25-50 pg	0,025 µg L <sup>-1</sup>	68
Águas naturais	Fluorescência	100-10000 ng mL <sup>-1</sup>	50 ng mL <sup>-1</sup>	70
Compostos derivados de aminas	Quimiluminescência	0,02-2000 µg L <sup>-1</sup>	0,02 µg L <sup>-1</sup>	71
Águas naturais	Espectrômetro de massa	0,4-10 µg L <sup>-1</sup>	0,1 0 µg L <sup>-1</sup>	72

### 3.2 – ELETROFORESE CAPILAR

You, Kaljurand e Koropchak<sup>42</sup> propuseram a determinação de glifosato empregando eletroforese capilar (CE) e detecção por ionização de eletrospray. Neste estudo, foi desenvolvida uma etapa de pré-lavagem com o intuito de reduzir a absorção de glifosato no CE capilar bem como reduzir o tempo de separação. A etapa de pré-lavagem do capilar foi feita por um tempo de aproximadamente 15 minutos antes da análise com brometo de N-cetiltrimetilamônio (CTAB). Em seguida, outra lavagem foi realizada com tampão acetato de amônio a pH 2,8, por cerca de 5 minutos.

Segundo os autores deste estudo<sup>42</sup>, o revestimento da parede capilar interna estabelecida por este tratamento durou cerca de 10 h, sem sangramento e não interferiu na medida do sinal analítico. Dados de calibração foram lineares para duas ordens de magnitude, o limite de detecção do instrumento foi de  $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o limite de detecção do método proposto foi de  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O método foi aplicado em amostras de água do lago, localizado na área rural, e em amostras de herbicidas comerciais, com resultados bastante satisfatórios.

Jiang e Lucy<sup>40</sup>, também proporam a determinação de glifosato em amostras de águas de rio por eletroforese capilar e detecção por fluorescência, com lasers de diodos de cor violeta, empregando naftaleno-2,3-dicarboxaldeído/cianeto (NDA), em meio micelar. Neste trabalho, o tratamento das amostras foi feito por meio de extração em fase sólida (SPE).

Para o desenvolvimento do procedimento de extração *offline*, uma micro-pipeta de 200  $\mu\text{L}$  foi empacotada com 50 mg de resina de troca aniônica (Bio-Rad AG1-X8) e nesta passaram 50 mL de amostras de águas de rio fortificadas com solução padrão de glifosato. De acordo com os autores<sup>40</sup> a otimização das condições de pré-tratamento das amostras, as etapas de extração e eluição de conversão permitiram a análise de glifosato na água do rio na faixa nanomolar.

Chang e Liao<sup>75</sup> proporam um método de análise simultânea para a determinação indireta de glufosinato, glifosato e AMPA empregando eletroforese capilar e detecção por fluorescência. No desenvolvimento deste método, os analitos de interesse (glufosinato, glifosato e AMPA) foram separados por, aproximadamente, 5 minutos com uma solução tampão fluorescente de 1,0 mM (pH 9,5). A solução fluorescente foi utilizada para a obtenção indireta de grupos fluoróforos das espécies não fluorescentes. Desta forma, os limites de detecção obtidos para todos os analitos estudados foram da ordem de mM.

Tabela 5 apresenta a comparação de alguns métodos propostos na literatura, para a determinação de glifosato, empregando eletroforese capilar.

**Tabela 5.** Características de alguns trabalhos, descritos na literatura, empregando eletroforese capilar.

Matriz	Tipo de detector	Faixa linear	Limite de detecção	Referências
Águas naturais e herbicidas comerciais	Espalhamento de luz	0,061-1,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	42
Águas de rio	Fluorescência	1,0-100 nM	0,04 nM	40
Herbicidas comerciais	Fluorescência	13-1600 $\mu\text{M}$	7,7 $\mu\text{M}$	73
Soja	Eletroquimiluminescência	0,169-16,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$	41

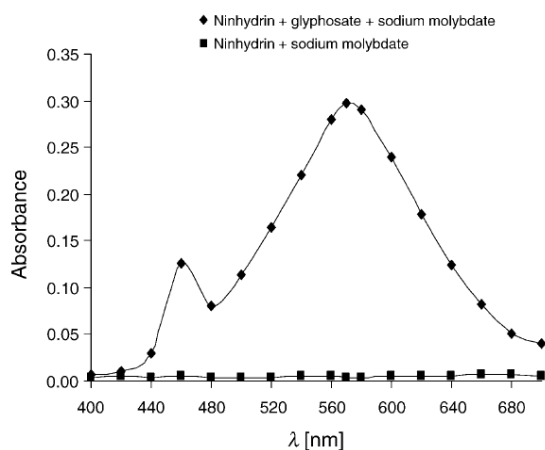
### 3.3 – MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

A espectrofotometria de absorção molecular é uma técnica muito utilizada no desenvolvimento de métodos analíticos, devido à simplicidade de operação, robustez e custo relativamente baixo<sup>74</sup>. Esta técnica é baseada na medida de absorção da radiação eletromagnética nas regiões do ultravioleta (UV) e visível (UV-Vis) do espectro eletromagnético.

Para a aplicação da espectrofotometria, assim como descrito para os métodos cromatográficos, a determinação de glifosato é feita empregando reagentes derivatizantes para a formação de produtos reacionais que apresentam absorção na região do UV ou UV-Vis<sup>23</sup>. Atualmente, existem estudos empregando análise espectrofotométrica na determinação de glifosato em diferentes matrizes como, por exemplo, águas naturais, solo, cereais e herbicidas comerciais<sup>38,75</sup>.

Em trabalho publicado por Bhaskara e Nagaraja<sup>38</sup> foi proposto um método espectrofotométrico sensível para determinação direta de glifosato em formulações comerciais (Roundup, Excel Mera) bem como amostras de águas naturais. O método foi baseado na reação entre glifosato e ninidrina, na presença de molibdato de sódio, em meio aquoso à temperatura de 100 °C.

De acordo com os autores<sup>38</sup> o produto reacional apresenta uma coloração púrpura de *Ruhemann*, com um máximo de absorção em 570 nm (Figura 13) e estabilidade por no mínimo 10 h.

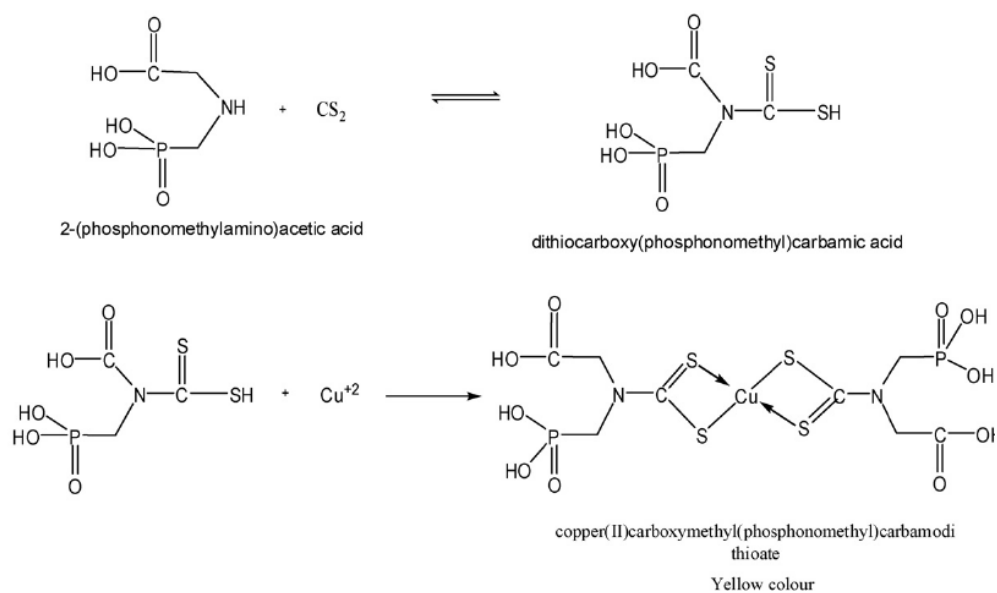


**Figura 13.** Espectro de absorção da solução do branco e do produto reacional.

**Fonte:** Bhaskara e Nagaraja<sup>38</sup>

A coloração do produto obtido com glifosato e ninidrina recebe este nome, tendo em vista que Siegfried Ruhemann foi o primeiro pesquisador a observar a cor da reação de ninidrina ( $C_9H_6O_4$ ) com aminoácidos, peptídeos e proteínas. Esta pesquisa, realizada em 1911, iniciou-se a partir do interesse na enolização de compostos cíclicos. Embora não tenha obtido sucesso com sua pesquisa, segundo West<sup>76</sup>, neste estudo verificou-se a formação de um composto bioquímico (triacetona monohidratado) que poderia ser empregado em análise traço de diferentes tipos de substâncias. Por isso foi considerada uma das grandes descobertas para a época.

Método espectrofotométrico, com absorção na região do UV-Vis, para a determinação de glifosato também foi proposto por Jan *et al.*<sup>75</sup>. Este método baseou-se na reação entre glifosato com disulfeto de carbono, para a converção o grupo amina do glifosato em ácido ditiocarbamato (produto intermediário). Nesta reação, o grupo ditiocarbamato reage com o grupo ligante e promove a complexação com o íon metálico ( $Cu^{2+}$ ), formando um produto colorido com absorção máxima em 435 nm (Figura 14).



**Figura 14.** Provável mecanismo de reação entre glifosato e ditiocarbamato.

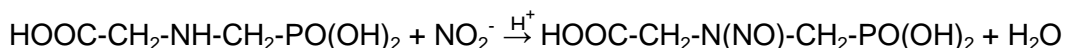
**Fonte:** Jan *et al.*<sup>75</sup>

### 3.4 – OUTROS

Teófilo *et al.*<sup>77</sup> desenvolveram um método voltamétrico para a determinação de glifosato em amostras de solo, água e vegetais, após pré-tratamento e derivatização das amostras. Para a aplicação da voltametria com pulso diferencial, ensaios foram realizados empregando eletrodo de mercúrio (HMDE).

Neste estudo, as variáveis envolvidas no sistema, tais como voltagem, tempo de voltagem, amplitude e intervalo de pulso e concentração do eletrólito, foram otimizadas por meio do planejamento fatorial completo (2<sup>5</sup>) e planejamento composto central (superfície de resposta). Após estabelecer as condições de trabalho, o sistema proposto apresentou uma faixa operacional de 0,050 a 100,0 mg dm<sup>-3</sup> e os limites de detecção e quantificação foram 14 mg dm<sup>-3</sup> e 48 µg dm<sup>-3</sup>, respectivamente.

Artigo publicado por Xiao *et al.*<sup>43</sup> descreveram a aplicação de titulação oscilométrica, empregando corrente alternativa, para a determinação de glifosato em amostras de águas naturais. O princípio do método baseia-se na medida de reação de nitrosação obtida a partir da reação da amina secundária da molécula de glifosato com nitrito, em meio ácido, conforme descrito na reação a seguir:



De acordo com os autores<sup>43</sup>, o ponto final da titulação foi obtido pela diminuição acentuada da intensidade da corrente no sistema com eletrodo de platina. Os resultados obtidos apresentaram uma boa faixa linear ( $7,16 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  a  $4,14 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e as medidas, realizadas em triplicata, apresentaram baixos valores de desvio padrão relativo (DPR < 3 %).

Em trabalho recente, publicado por Colombo e Masini<sup>78</sup>, a determinação de glifosato foi feita empregando sistema em fluxo. Neste trabalho desenvolveu-se um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) com detecção por fluorimetria. O método proposto baseou-se na medida do produto reacional fluorescente, 1-(2-hidroxi-etil)-2-N-alquilisindol, obtido a partir da oxidação da glicina, utilizando hipoclorito a 48 °C, e reação com o reagente fluorimétrico *o*-ftaldialdeído (OPA), na presença de 2-mercaptoetanol em tampão de borato (pH = 9).

O método proposto<sup>78</sup> apresentou linearidade na faixa de 0,25 e 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com limites de detecção e quantificação de 0,08  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Neste método, a frequência analítica obtida foi de aproximadamente 18 amostras por horas. O método proposto foi aplicado no estudo das propriedades de isothermas de adsorção/dessorção em amostras de solo e sedimento, como resultados satisfatórios. Além disso, o método apresentou vantagens como rapidez na obtenção dos resultados e baixo consumo de soluções de amostra e reagente quando comparado com os métodos cromatográficos.

Estudo realizado por Keshteli, Farahbakhsh e Savagebi<sup>79</sup> avaliaram a adsorção do glifosato em amostras de solo. Neste estudo, após a obtenção das características físico-químicas referentes às propriedades do solo, a isoterma de adsorção do glifosato foi avaliada pela equação de Langmuir e equação de Freundlich, as quais apresentaram coeficiente de adsorção (KL e Kf) na faixa de 0,326 L Kg<sup>-1</sup> a 1,089 L Kg<sup>-1</sup> e 42,52 L Kg<sup>-1</sup> a 77,46 L Kg<sup>-1</sup>, respectivamente.



De acordo com os pesquisadores<sup>79</sup>, a utilização da equação de Langmuir, em todos os ensaios, foi mais satisfatória, em relação à equação de Freundlich. O coeficiente máximo de absorção obtido, empregando ambas as equações (KL e Kf), foi para as amostras de solo que apresentavam alto teor de carbono, sendo bastante concordante com dados apresentados na literatura.

González-Martínez *et al.*<sup>33</sup> desenvolveram um sistema de imunossensor automatizado para a determinação de glifosato, com base na captura de um imunocomplexo. Neste estudo, para a aplicação do sensor, inicialmente, o analito foi derivatizado *online*, por meio uma solução seletiva anti-glifosato, para a obtenção de uma enzima peroxidase de glifosato<sup>70</sup>, e posterior detecção por fluorescência.

Sob as condições ótimas de trabalho, o limite de detecção encontrado foi de 0,021  $\mu\text{g L}^{-1}$  e a frequência analítica de 25 minutos por ensaio. Segundo os autores, o sensor apresenta uma autonomia de uso de, aproximadamente, 48 hs. Assim, este por ser reutilizado por mais de 500 ciclos de medidas com resultados bastante significativos, uma vez que o sensor utilizado é seletivo para a molécula de glifosato.

## 4 – RELEVÂNCIA DO TEMA

As propriedades químicas do glifosato (Anexo 2) e do seu principal produto de degradação, ácido aminometilfosfônico (AMPA) contribuem para a dificuldade na detecção destes resíduos em produtos provenientes de origem agrícola e/ou amostras ambientais, justificando desta forma a importância de estudos destas espécies de poluentes no ambiente<sup>39,80</sup>.

Embora os métodos cromatográficos sejam os métodos de análise mais empregados, a alta polaridade e solubilidade destes compostos em água dificulta a extração e limita as opções das técnicas de derivatização padrão frequentemente empregado em cromatografia<sup>45</sup>.

Em geral, o procedimento de derivatização necessita de várias etapas de preparo de amostra para melhorar a resolução e seletividade, como, por exemplo, longo tempo de extração e análise, utilização de solventes tóxicos e possibilita a formação de substâncias interferentes durante o processo de análise<sup>41</sup>. Devido a este fato, o uso de metodologias que não necessitem de derivatização tem merecido especial atenção.

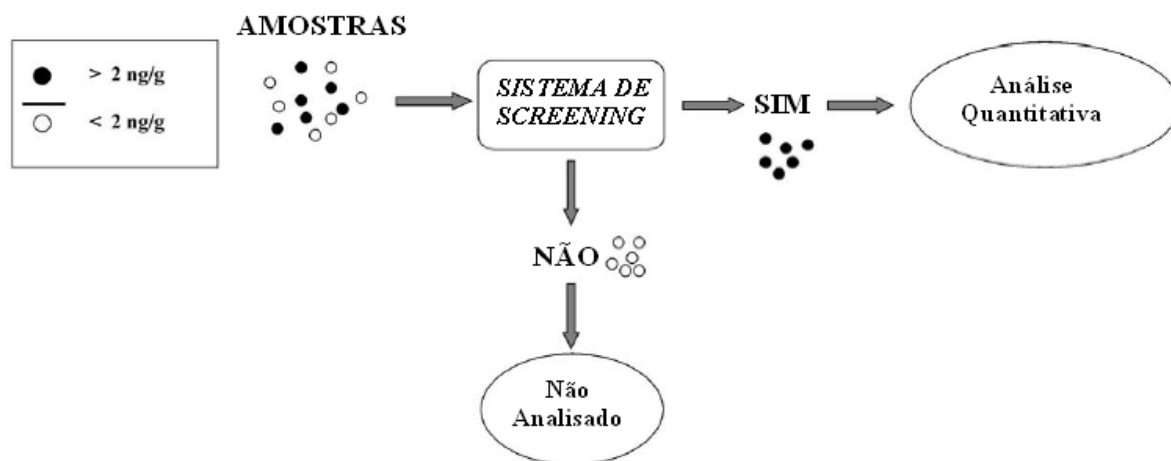
Atualmente, o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, simples e baixo custo é uma das áreas de grande interesse, especialmente na área ambiental quando decisões rápidas são necessárias. Além disso, no desenvolvimento de novos métodos analíticos, a quantidade e toxicidade dos reagentes utilizados e o resíduo produzido são importantes itens a ser considerado no método que se pretende aplicar. Por isso, há necessidade de desenvolvimento de métodos que não sejam prejudiciais ao homem e ao ambiente.

### 4.1 – SISTEMAS DE *SCREENING* E QUÍMICA VERDE

Os métodos de *screening* ou métodos de triagem tem como objetivo principal confirmar a presença ou ausência de um ou mais analito em uma dada amostra bem como o desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos e com baixo consumo de reagentes.

Os sistemas de *screening* possibilitam, após a escolha de reações adequadas, a identificação e seleção de um ou mais analitos de interesse, em amostras complexas, de acordo com um critério pré-estabelecido<sup>81</sup>. Os resultados por meio dos sistemas de *screening* são fornecidos através de um sinal indicado com base em uma resposta binária (sim ou não),

se o analito está acima ou abaixo de uma concentração pré-estabelecida como limite (Figura 15)<sup>82</sup>. Desta forma, proporciona análise rápida, eficiente e de baixo custo em relação aos métodos analíticos convencionais.



**Figura 15.** Esquema de um sistema de *screening* de amostras contendo concentrações menor e maior que  $2 \text{ ng g}^{-1}$  de analito.

**Fonte:** Trullols, Ruisánchez e Rius<sup>83</sup>

Embora os sistemas de *screening* forneçam informações seguras, os mesmos requerem técnicas analíticas complementares, como, por exemplo, espectrofotometria, cromatografia, ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*)<sup>84-86</sup>. Desta forma, a utilização de procedimentos analíticos para a obtenção de uma resposta, permitem análises simples, rápidas, eficientes e de baixo custo, pode ser uma nova alternativa de análise.

Neste contexto, a utilização de métodos *screening* combinada à utilização de métodos de análise que necessita pequenas quantidades de analito, substituição de solventes tóxicos por solventes não tóxicos, minimização de geração de resíduo e baixo ou nenhum risco ao operador e ao ambiente, tem despertado interesse nos últimos anos.

As indústrias, devido à produção em larga escala, são as principais fontes de contaminação ambiental, porque estas geram quantidade de resíduo (tóxicos ou não tóxicos) que são descartados de forma inadequada no ambiente. Por isso há preocupação em investir em métodos alternativos de processos para que os tornem ambientalmente amigáveis.

A química verde, também conhecida como química limpa ou ambientalmente amigável é regida por 12 princípios fundamentais para manter ou melhorar a qualidade de vida sem causar prejuízo ambiental<sup>82, 87, 88</sup>.

De acordo com Prado<sup>89</sup>, em seu artigo de divulgação, a aplicação da química verde tem como principal desafio a conscientização para o desenvolvimento de tecnologias limpas no lugar das atuais, já que a química exerce um papel importante na fabricação de inúmeros produtos fundamentais à sociedade.

## 5 – OBJETIVOS

### 5.1 – OBJETIVO GERAL

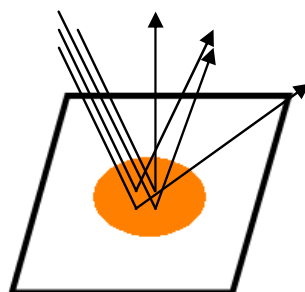
- ✓ Desenvolver métodos de análises simples, rápidos, sensíveis, precisos e que atendam aos princípios da Química Verde para a determinação de glifosato em amostras de herbicidas comerciais e de interesse ambiental.

### 5.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver métodos limpos para a quantificação de glifosato em amostras de herbicidas comerciais e amostras ambientais;
- ✓ Desenvolver sistemas de *screening*, de acordo com o método proposto, para a obtenção de respostas rápidas sobre o analito em questão.
- ✓ Otimizar as condições experimentais empregando análises quimiométricas, por meio de planejamento fatorial e superfície de resposta;
- ✓ Validar os métodos propostos através das principais figuras de mérito;
- ✓ Aplicar os métodos desenvolvidos na determinação do teor de glifosato em diferentes amostras de herbicidas comerciais e amostras ambientais.

## 6 – ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA

O desenvolvimento de novos dispositivos ópticos, como fibras ópticas ou esferas de reflectância associada ao uso do *spot test*, tem dado a espectroscopia de reflectância difusa uma grande importância em química quantitativa<sup>90</sup>. Esta técnica baseia-se na medida da radiação refletida ( $T_R$ ) por uma superfície irregular, que pode ser papel de filtro ou pastilhas de sílica gel, sendo esta composta por componentes especulares e componentes difusas (Figura 16)<sup>91</sup>.



**Figura 16.** Radiação difusa refletida.

A reflexão difusa acontece após a penetração da radiação incidente no interior do sólido, as quais retornam à superfície da amostra depois de ter sofrido absorção e reflexões múltiplas nas superfícies de cada uma das partículas que a compõem.

A intensidade óptica de medidas de reflectância difusa é análoga às medidas de absorbância (Eq. 1):

$$A_R = - \log T_R \quad (1)$$

Onde:  $A_R$  é similar à radiação absorvida e  $T_R$  à radiação transmitida.

Dentre as teorias existentes, a que melhor descreve a espectroscopia de reflectância difusa é a equação de Kubelka-Munk (Eq. 2 e 3), uma vez que para soluções diluídas o coeficiente de absorção molar varia linearmente com a concentração do analito<sup>91,92</sup>.

$$f(R) = K / S \quad (2)$$

$$K = 2,303 \cdot \epsilon \cdot C \quad (3)$$

Onde: R refere-se à radiação refletida; **K** ao coeficiente de absorção molar; **S** ao coeficiente de dispersão;  $\epsilon$  à absorvidade molar e **C** à concentração.

Em análise quantitativa, o procedimento para a realização do *spot test* deve ser bem elaborado, de modo que haja uniformidade na cor da mancha formada e, conseqüentemente, uma boa precisão das medidas.

Neste estudo, empregou-se a espectroscopia de reflectância difusa para a determinação de glifosato em amostra de herbicidas comerciais e em amostras de água. O método proposto baseia-se na reação entre glifosato e *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) em meio ácido, o qual produz um composto que apresenta um máximo de absorção na região do visível (495 nm).

## 6.1 – PARTE EXPERIMENTAL (ENSAIOS PRELIMINARES)

### 6.1.1 – Materiais e Equipamentos

- ✓ Sistema de purificação de água da marca Milli-Q, modelo Millipore, RO15, foi utilizado na purificação da água (18 M $\Omega$  cm) empregada no preparo de soluções.
- ✓ Micropipetas, da marca Brand (100-1000  $\mu$ L e 10-100  $\mu$ L), foram utilizadas para medir o volume das soluções.
- ✓ Balança analítica AG204, da marca Mettler Toledo, foi utilizada na pesagem do reagente cromogênico (*p*-DAC).
- ✓ pHmetro, da marca Tecnal, foi utilizado para medir o pH das amostras ensaiadas.
- ✓ Banho de ultrassom, da marca Thornton, foi utilizado para solubilização do reagente cromogênico.

- ✓ Banho de aquecimento, da marca Marconi, com temperatura controlada, foi utilizado na pré-concentração das amostras de águas ensaiadas.
- ✓ Estufa, da marca Tecnal (TE 394/1), com temperatura controlada e recirculação de ar, foi utilizada na secagem dos *spot tests*.
- ✓ Papel de filtro qualitativo, da marca Whatman 41, foi utilizado como suporte sólido na medida de absorbância dos *spot tests*.
- ✓ Cartuchos de Strata-X (200 mg), fase reversa, foram utilizados no preparo da coluna para o tratamento das amostras de água.
- ✓ Acessório de reflectância difusa Labspere RSA acoplado a um espectrofotômetro Hewlett Packard 8453, de feixe único com lâmpadas de tungstênio e deutério e com detector de arranjo de diodos, foi utilizado nas determinações analíticas das amostras.
- ✓ Reflectrômetro acoplado a um espectrofotômetro Ocean Optics da marca USB 2000, de feixe único e lâmpada de tungstênio, também, foi utilizado nas determinações analíticas das amostras.

### 6.1.2 – Reagentes

- ✓ Glifosato (Sigma-Aldrich, 96 %)
- ✓ *p*-Dimetilaminocinamaldeído (Aldrich, 98 %)
- ✓ Ácido acético glacial (Merck, 99 %)
- ✓ Nitrito de sódio (Riedel-de Haën, 99%)
- ✓ Ácido sulfúrico (Mallinckrodt AR<sup>®</sup>, 98%)
- ✓ Formaldeído (Mallinckrodt AR<sup>®</sup>, 37%)
- ✓ Isopropilamina (Vetec Química, PA)
- ✓ Polioxietileno lauril éter (Vetec Química, PA)
- ✓ Glufosinate (Fluka analytical, 100 mg)
- ✓ Sulfato de cobre (Synth, 99%)



- ✓ Sulfato de manganês (Riedel-de Haën, 99,7%)
- ✓ Cloreto de ferro (III) (Merck, 99%)
- ✓ Sulfato de zinco (QM ACS<sup>®</sup>, 99%)
- ✓ Sulfato de sódio (Synth, 99%)
- ✓ Carbonato de sódio (Reagen, 99,5%)
- ✓ Nitrato de sódio (Mallinckrodt AR<sup>®</sup>, 99,5%)
- ✓ Fosfato de potássio (Vetec, 99,5%)
- ✓ Citrato de sódio (Riedel-de Haën, 99%)

### 6.1.3 – Preparo das Soluções

#### 6.1.3.1 – Solução de *p*-DAC (0,087 % m/v) em HCl (0,0830 mol L<sup>-1</sup>)

Pesou-se aproximadamente 0,0087 g de *p*-DAC e transferiu-se para um balão de 10,00 mL, em seguida adicionou-se 81,5 µL de HCl (37 %), após a completa dissolução da massa de *p*-DAC em banho de ultrassom, completou-se o volume com água deionizada.

#### 6.1.3.2 – Solução de *p*-DAC (0,135 % m/v) em HAc (3,00 mol L<sup>-1</sup>)

Ensaio iniciais foram realizados com *p*-DAC 0,101 % em diferentes concentrações de HAc (0,50 mol L<sup>-1</sup>; 1,00 mol L<sup>-1</sup>; 2,00 mol L<sup>-1</sup>; 3,00 mol L<sup>-1</sup> e 3,50 mol L<sup>-1</sup>), as quais mostraram uma solução turva, referente a dissolução incompleta da massa de *p*-DAC, em concentrações menores que 3,00 mol L<sup>-1</sup>. Desta forma, para o preparo desta solução, pesou-se aproximadamente 0,0135 g de *p*-DAC e transferiu-se para um balão de 10,00 mL, em seguida adicionou-se 3,90 mL de HAc padronizado (7,70 mol L<sup>-1</sup>) e completou-se o volume com água deionizada.

A padronização da solução de HAc foi feita de acordo com a recomendação da literatura<sup>93</sup>.

### 6.1.3.3 – Soluções padrão de glifosato

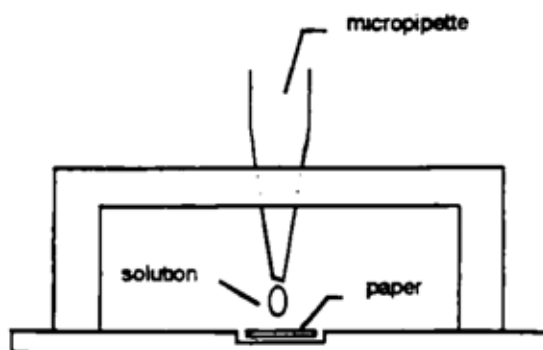
Em todos os ensaios preliminares, planejamento experimental e avaliação da estabilidade óptica, a concentração final da solução de glifosato utilizada foi de  $3,01 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta solução foi preparada a partir da pesagem de 0,0752 g de glifosato padrão e diluída com água purificada no sistema de Milli-Q para 25,00 mL.

Para a obtenção da curva de calibração, as soluções-padrão de trabalho utilizada, na determinação de glifosato, foram preparadas mediante diluições adequadas da solução-estoque de  $3,01 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$  para a obtenção das seguintes soluções de concentrações finais de:  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $300 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $430 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $630 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $930 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $1,30 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 6.1.4 – Preparo dos *Spot Tests*

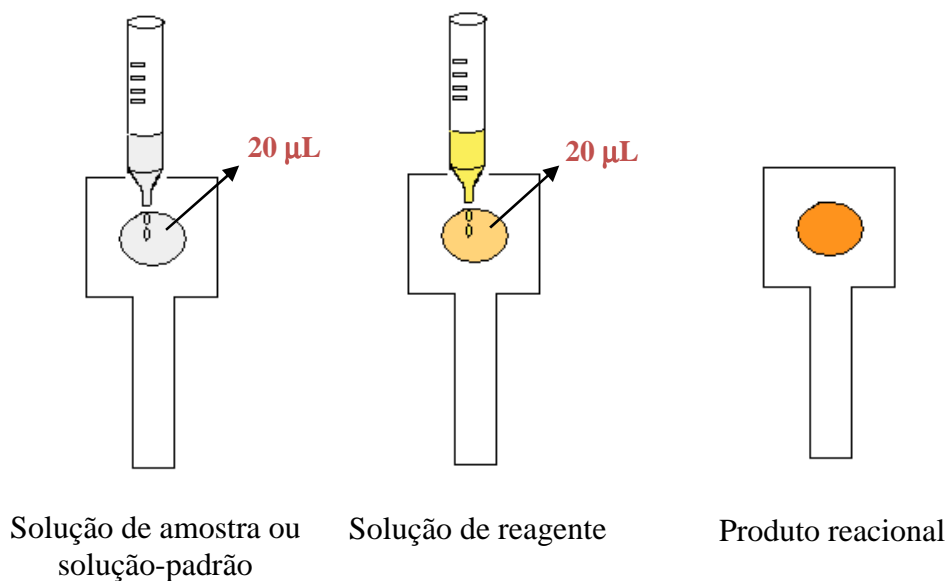
Alíquotas de 20,0  $\mu\text{L}$  das soluções de amostra e reagente foram adicionada ao papel de filtro, nas dimensões 2 cm de altura e 2 cm de largura, aproximadamente, e uma haste para o manuseio.

Na base de um suporte (Figura 17)<sup>94</sup> foi colocado o papel de filtro e após o encaixe da micropipeta no suporte, localizado no centro do papel, as soluções foram colocadas consecutivamente. Após a obtenção do produto reacional, foi feita a medida do sinal analítico ( $A_R$ ).



**Figura 17.** Suporte utilizado no preparo dos *spot tests*.

Os *spot tests* foram feitos utilizando a seguinte ordem de adição: 20,0  $\mu\text{L}$  de solução de analito (solução padrão de glifosato ou solução de amostra, em  $\text{pH} = 2,0$ ) e em seguida 20,0  $\mu\text{L}$  de solução de reagente (Figura 18), após a secagem ao ar por 1 minuto, para à obtenção de uma mancha com maior uniformidade.



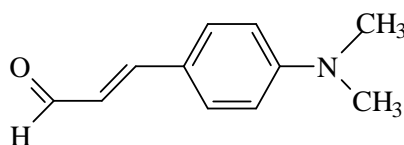
**Figura 18.** Metodologia de preparo dos *spot tests* e ordem de adição das soluções empregadas para a obtenção do produto reacional.

### 6.1.5 – Metodologia Empregada

Inicialmente foram realizados ensaios qualitativos preliminares, com o objetivo de definir uma reação adequada para a aplicação da espectroscopia de reflectância difusa, por ser um método limpo, já que se utilizam reagentes não tóxicos (*p*-DAC). Além disso, para a aplicação desta técnica são necessários volumes da ordem de microlitros ( $\mu\text{L}$ ), diminuindo, assim, a quantidade de resíduo gerado.

Estudos das propriedades físico-químicas realizados por Amarante Júnior *et al.*<sup>20</sup> mostram que o glifosato apresenta um grau de dissociação de 0,8; fornecida pela constante de dissociação ( $\text{pK}_1$ ) em baixos valores de  $\text{pH}$  (Figura 8), indicando que a maior parte do glifosato encontra-se com uma protonação no sítio da amina.

Dentre os ensaios qualitativos realizados com glifosato, os que apresentaram resultados satisfatórios, para a aplicação da espectroscopia de reflectância difusa na região UV-Vis foi utilizando o *p*-DAC (Figura 19), como reagente cromogênico, em meio ácido.



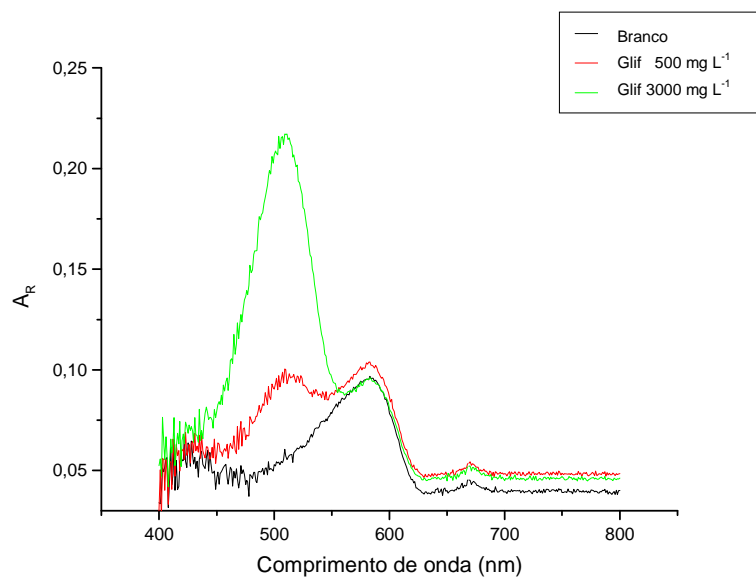
**Figura 19.** Estrutura do *p*-DAC.

Segundo Gotardo *et al.*<sup>95</sup> o *p*-DAC em meio ácido tem sido bastante aplicado na determinação de grupos aminas, uma vez que esta reação envolve a condensação do grupo amino protonado com o grupo carbonila do reagente formando um sal imino.

O *p*-DAC tem sido um dos reagentes mais empregados no desenvolvimento de métodos analíticos por nosso grupo de pesquisa, devido às vantagens inerentes ao seu uso como, por exemplo, alta sensibilidade, especialmente em meio micelar, facilidade de aquisição e armazenamento, obtenção de produtos reacionais estáveis e nenhum risco ao operador durante manipulação.

#### 6.1.5.1 – Aplicação do ácido clorídrico (HCl)

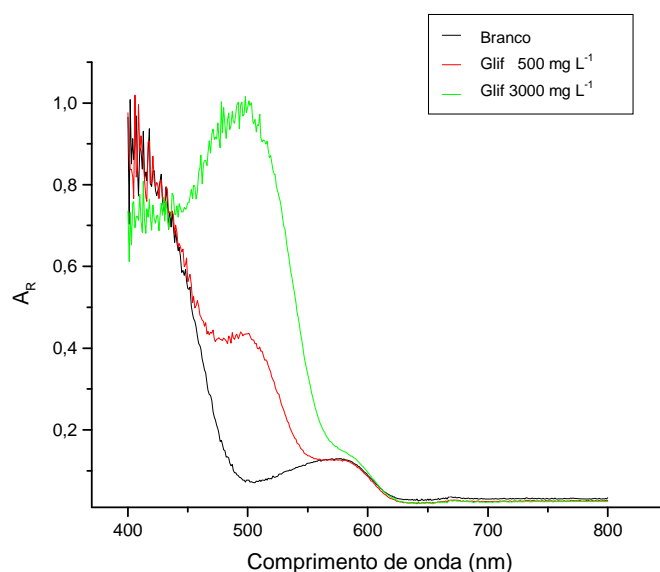
Ensaio qualitativo através de *spot test* empregando meio aquoso acidificado com HCl, no preparo da solução de *p*-DAC com soluções padrão de glifosato, com concentrações de 500 mg L<sup>-1</sup> e 3,01 x 10<sup>3</sup> mg L<sup>-1</sup>, apresentaram bandas de absorção em 510 nm, referente à banda de absorção do produto reacional (glifosato-*p*-DAC) e em 580 nm, referente à banda de absorção do *p*-DAC, conforme apresentado na Figura 20.



**Figura 20.** Espectro de absorção do produto reacional obtido em *spot test*, empregando concentrações de glifosato de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  e  $3,01 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ , em meio acidificado com HCl.

#### 6.1.5.2 – Aplicação do ácido acético (HAc)

Ensaio qualitativos, também com *spot test*, foram realizados empregando meio acidificado com HAc, os quais apresentaram bandas de absorção em 495 nm, referente à banda de absorção do produto reacional (glifosato-*p*-DAC) e em 580 nm referente à banda de absorção do *p*-DAC, conforme apresentado na Figura 21.



**Figura 21.** Espectro de absorção do produto reacional obtido em *spot test*, empregando concentrações de glifosato de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  e  $3,01 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ , meio acidificado com HAC.

Considerando o ensaio realizado empregando concentração de glifosato de  $3,01 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$  e comparando os valores de reflectância encontrados para ambos produtos de reação; 0,2270 em 510 nm (Figura 20) e 1,020 em 495 nm (Figura 21), a obtenção do sinal analítico com uma reação de maior sensibilidade foi empregando o HAC no meio reacional.

A partir destes dados foi realizada a otimização das condições experimentais para a determinação de glifosato por espectroscopia de reflectância difusa através do planejamento composto central.

### 6.1.5.3 – Planejamento experimental

A otimização das condições experimentais, para o emprego da espectroscopia de reflectância difusa, proposto para determinação de glifosato, foi feito por meio de análise quimiométrica empregando o planejamento composto central, para a obtenção da superfície de resposta<sup>96</sup>.

As variáveis estudadas foram concentração de *p*-DAC e concentração de HAC codificadas em níveis conforme apresentada na Tabela 6.

**Tabela 6.** Níveis estabelecidos no planejamento experimental para as variáveis *p*-DAC e HAc.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+ 1	+ 1,41
<i>C<sub>p</sub></i> -DAC (% m/v)	0,066	0,084	0,14	0,19	0,21
CHAc (mol L <sup>-1</sup> )	3,40	3,72	4,50	5,28	5,60

As concentrações de *p*-DAC e HAc foram selecionadas de acordo com testes preliminares para a obtenção da matriz de experimento. Para a realização deste planejamento, foram feitas combinações de diferentes níveis perfazendo um total de doze ensaios.

As concentrações finais de HAc e *p*-DAC dos ensaios estabelecidas pelos níveis, bem como os valores de reflectância difusa e seus respectivos coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Matriz utilizada para a obtenção da superfície de resposta, valores de reflectância e os respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3).

Ensaio	CHAc (mol L <sup>-1</sup> )	<i>C<sub>p</sub></i> -DAC (% m/v)	<i>A<sub>R</sub></i> (495nm)	DPR (%)
1	3,72	0,084	0,752	1,2
2	5,28	0,084	0,766	2,4
3	3,72	0,19	0,771	3,1
4	5,28	0,19	0,728	1,3
5	4,50	0,14	0,819	0,52
6	4,50	0,14	0,833	0,94
7	4,50	0,14	0,835	1,6
8	4,50	0,14	0,876	8,1
9	3,40	0,14	0,852	7,8
10	5,60	0,14	0,759	0,56
11	4,50	0,066	0,695	4,4
12	4,50	0,21	0,790	4,0

#### 6.1.5.4 – Estabilidade do produto da reação

A avaliação da estabilidade do produto colorido obtido foi realizada por meio de medidas de refletância difusa, em intervalos de 5 minutos, para o monitoramento destas, em 495 nm durante o período de 60 minutos. Neste estudo, a primeira medida foi feita 1 minuto após a obtenção do *spot test*.

#### 6.1.5.5 – Aquisição e preparo das amostras para análise

Para a aplicação do método proposto, três amostras de diferentes marcas (A, B e C) de herbicidas comerciais contendo glifosato como ingrediente ativo, com conteúdo nominal de  $360 \text{ g L}^{-1}$  (teor declarado pelo fabricante) de glifosato em sua forma ácida, foram adquiridas em lojas agroquímicas da cidade de Araraquara (São Paulo).

O preparo das amostras de herbicidas comerciais para a determinação de glifosato foi feita empregando pré-tratamento das amostras que consistiu na extração do glifosato a partir da amostra de herbicida e sem pré-tratamento (análise direta).

##### 6.1.5.5.1 – Empregando pré-tratamento da amostra

As soluções de trabalho das amostras ensaiadas foram feitas empregando o método de extração do glifosato em meio ácido, para as quais utilizou alíquotas de 0,250 mL das amostras de A e B e 0,500 mL para a amostra C (esta última apresenta menor teor de glifosato na sua composição). Estas alíquotas foram colocadas em béqueres de 10,00 mL, e em seguida, adicionou-se lentamente algumas gotas de HCl (concentrado) até a obtenção de um precipitado. Este foi deixado em repouso por aproximadamente 24 h, para garantir a precipitação completa do glifosato. Em seguida, a fase aquosa foi descartada com auxílio da pipeta de Pasteur e o precipitado lavado com acetona no próprio béquer.

Este procedimento foi adotado para minimizar erros, referentes à perda do precipitado, uma vez que se obteve pequena quantidade de sal formado no meio reacional. Após a retirada do resíduo de surfactante, o sal obtido foi dissolvido em água deionizada, e em seguida, corrigiu-se o pH para diferentes valores (2,00; 4,00; 6,00 e 8,00), com solu-



ções de NaOH e HCl (ambos diluídos) e as soluções foram transferidas para balões de 25,00 mL e completou-se o volume com água deionizada.

#### 6.1.5.5.2 – Sem pré-tratamento da amostra

As determinações dos teores de glifosato nas amostras de herbicidas comerciais, também, foram realizadas empregando o procedimento descrito anteriormente (item 6.1.5.5.1).

No entanto, para este estudo utilizou-se análise direta das amostras, para a obtenção de um método de análise com etapa de preparo de soluções de trabalho mais simples possível.

Então, para este ensaio utilizou-se alíquotas de 0,250 mL das amostras de A e B e 0,500 mL para a amostra C e estas foram colocadas em béqueres de 25,00 mL, contendo aproximadamente 20,00 mL de água deionizada. Em seguida, corrigiu-se o pH, para diferentes valores (2,00; 4,00; 6,00 e 8,00), com soluções de NaOH e HCl (ambos diluídos) e foram transferidas para balões de 25,00 mL e completou-se o volume com água deionizada.

Neste estudo, os ensaios realizados para a otimização das condições experimentais bem como na obtenção das figuras de mérito foram feitos em triplicata e os resultados foram analisados utilizando os softwares *Statistica*, versão 6.0 e *Origin*, versão 7.0.

## 6.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO OBTIDOS COM OS ENSAIOS PRELIMINARES

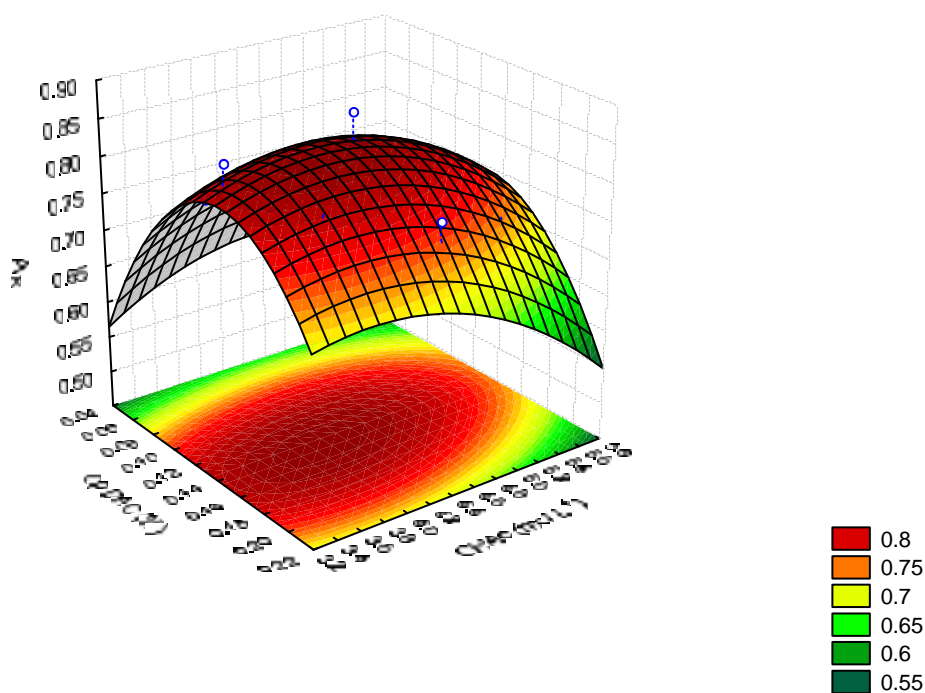
### 6.2.1 – Planejamento Experimental

A aplicação de técnicas matemáticas e estatísticas para a obtenção de informações significativas de dados analíticos pode ser usada na exploração de informações relevantes<sup>97</sup>. As técnicas de análise quimiométricas tais como planejamento composto central, por ser um modelo matemático quadrático, conforme descrito na Equação 4, permite avaliar criticamente a condição ótima para a realização dos experimentos por meio do gráfico de superfície de resposta<sup>96</sup>.

$$Z = -0,417 + 0,356 x - 0,037 x^2 + 7,65 y - 21,99 y^2 - 0,366 xy \quad (4)$$

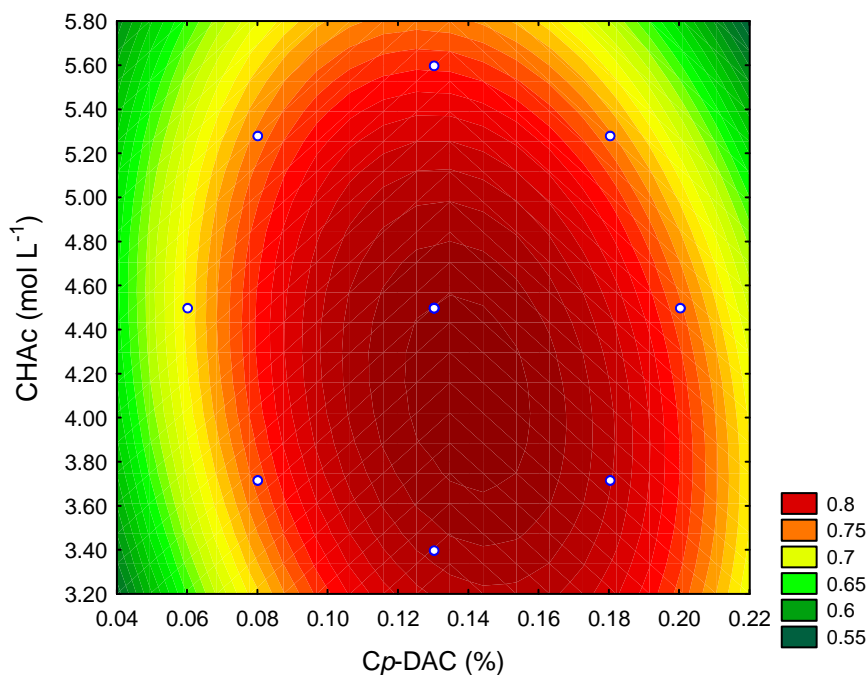
Onde:  $Z$  refere-se ao valor de reflectância difusa, em 495 nm,  $x$  a concentração de  $p$ -DAC (%) e  $y$  a concentração de HAc ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

Conforme o gráfico da superfície de resposta obtido (Figura 22), a região central da superfície apresenta um sinal analítico de melhor resposta, devido ao valor de reflectância máximo encontrado (0,8) de acordo com os níveis em que as variáveis foram estudadas.



**Figura 22.** Gráfico, tridimensional, da superfície de resposta das variáveis  $p$ -DAC e HAc.

Este resultado também pode ser claramente visualizado na Figura 23, a qual apresenta a curva de nível referente ao gráfico da superfície de resposta obtido.



**Figura 23.** Gráfico da curva de nível correspondente à superfície de resposta da Figura 22.

A Tabela 8 apresenta as concentrações de *p*-DAC e HAc estimadas como melhor resposta do sinal analítico bem como valores de reflectância difusa, calculada pelo programa computacional empregado, conforme Equação 4, e medidas experimentalmente.

**Tabela 8.** Concentrações dos reagentes em condições ótimas de trabalho e seus respectivos valores de reflectância difusa (495 nm).

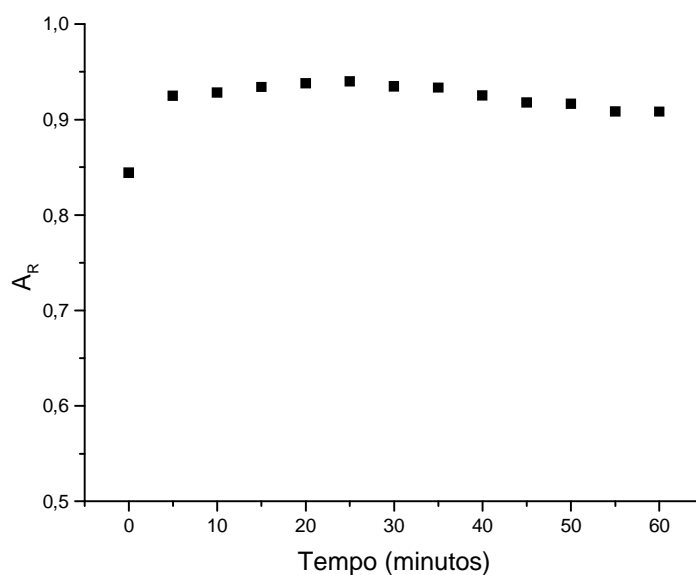
Reagentes	Valores críticos	$A_R$ calculado	$A_R$ medido
<i>Cp</i> -DAC (% m/v)	0,14	0,847	0,852 (0,82 %)*
CHAc (mol L <sup>-1</sup> )	4,09		

\* Desvio padrão relativo (n = 3).

Comparando estatisticamente por meio de cálculos empregando a ANOVA<sup>98</sup>, verifica-se que o valor de reflectância difusa calculado com os valores de reflectância difusa medido não são significativamente diferentes ( $P = 0,5823$  e  $F = 0,3776$ ), ao nível de 95% de confiabilidade.

### 6.2.2 – Estabilidade do Produto Reacional

A Figura 24 apresenta o gráfico da estabilidade do produto reacional formado para o monitoramento do sinal por espectroscopia de reflectância difusa.

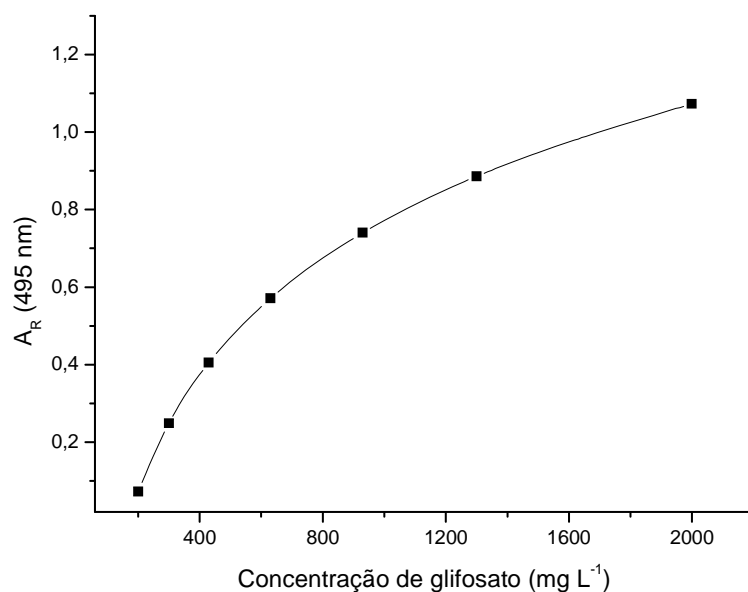


**Figura 24.** Estabilidade do produto reacional por um período de 60 minutos.

A Figura 24 apresenta a estabilidade da reação entre o *p*-DAC (0,14 %) em HAc (4,09 mol L<sup>-1</sup>) e glifosato (3,01 x 10<sup>3</sup> mg L<sup>-1</sup>) de acordo com as condições ótimas obtidas pelo planejamento de composto central. Estes resultados indicam que as medidas podem ser realizadas em um intervalo de 5 a 60 minutos, pois durante este intervalo de tempo as medidas de reflectância difusa não apresentam variação significativa de sinal analítico.

### 6.2.3 – Curva Analítica

A curva analítica empregada para a análise de glifosato em amostras de herbicidas comerciais variou na faixa de 2,00 x 10<sup>2</sup> mg L<sup>-1</sup> a 2,00 x 10<sup>3</sup> mg L<sup>-1</sup>. Desta forma, o gráfico desta apresentou-se em formato de uma parábola (Figura 25).



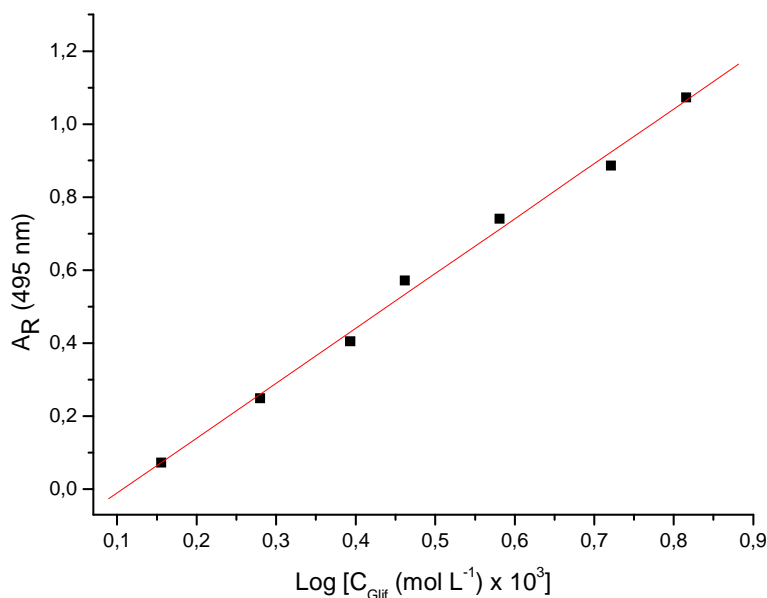
**Figura 25.** Curva analítica obtida para a determinação de glifosato, empregando faixa de concentração de  $2,00 \times 10^2 \text{ mg L}^{-1}$  a  $2,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ .

Assim, fez-se a aplicação da equação logarítmica com um fator multiplicador (1000), para a obtenção da faixa linear da curva, conforme descrito na Equação 5.

$$\mathbf{X'} = \text{Log} [\text{C}_{\text{Glif}} (\text{mol L}^{-1}) \times 10^3] \quad (5)$$

Onde  $\mathbf{X'}$  refere-se ao logaritmo da concentração padrão de glifosato ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

A Figura 26 apresenta a curva de calibração obtida, a partir da aplicação da equação logarítmica, empregando diferentes concentrações de glifosato ( $\text{mol L}^{-1}$ ) em função dos valores de reflectância difusa ( $A_R$ ), na qual se verifica uma relação linear na faixa de 0,0726 a 1,07, referente ao intervalo de concentração de  $2,00 \times 10^2 \text{ mg L}^{-1}$  a  $2,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Figura 26.** Curva de calibração, empregada para a determinação de glifosato, obtida a partir da aplicação da equação logarítmica nos dados da curva analítica apresentada na Figura 25.

#### 6.2.4 – Validação do Método

Embora não haja consenso sobre quais parâmetros devem ser empregados, a validação do método proposto pode ser realizada escolhendo testes necessários e critérios aceitáveis para um determinado método<sup>99,100</sup>. Neste trabalho, os parâmetros de validação utilizados foram: limite de detecção, limite de quantificação e teste de recuperação.

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram calculados segundo as recomendações da IUPAC<sup>101</sup>, usando as Equações 5 e 6.

$$LD = 3,33 \times (s/S) \quad (5)$$

$$LQ = 10 \times (s/S) \quad (6)$$

Onde  $s$  é o desvio padrão das medidas referentes ao branco ( $n = 10$ ) e  $S$  a inclinação da curva analítica.

A faixa linear da curva analítica obtida, valores de limites de detecção e quantificação bem como os demais parâmetros instrumentais estão sumarizados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Parâmetros instrumentais e figuras de mérito obtidos com os ensaios preliminares com espectroscopia de reflectância difusa.

Parâmetros	Valores críticos
<i>p</i> -DAC	20,0 µL (0,14 %)
HAc	20,0 µL (4,09 mol L <sup>-1</sup> )
Ordem de adição	Analito em seguida <i>p</i> -DAC/HAc
Faixa linear de trabalho	2,00 x 10 <sup>2</sup> mg L <sup>-1</sup> a 2,00 x 10 <sup>3</sup> mg L <sup>-1</sup>
Equação da reta	$A_R = 0,131 + 0,6575 \times \text{Log} [C_{\text{Glif}} (\text{mol L}^{-1}) \times 10^3]$
Coefficiente de correlação linear	0,998
Comprimento de onda	495 nm
Estabilidade do produto de reação	60 minutos
Limite de detecção	184,5 mg L <sup>-1</sup>
Limite de quantificação	220,2 mg L <sup>-1</sup>

Com os parâmetros instrumentais estabelecidos, a espectroscopia de reflectância difusa, empregando *spot tests*, foi aplicada às amostras de herbicidas comerciais. Os teores de glifosato encontrado nas amostras elencadas e os respectivos desvio padrão relativo (DPR), em diferentes pHs estão apresentados nas Tabelas 10 e 11.

**Tabela 10.** Concentração obtida a partir da extração do glifosato, em meio ácido, em diferentes pHs.

Amostras	pH	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	DPR (%)
A	2,00	49,19	2,05
	4,00	139,1	7,10
	6,00	74,40	4,68
	8,00	73,93	11,9
B	2,00	52,97	2,82
	4,00	55,89	5,70
	6,00	55,23	4,00
	8,00	55,25	4,87
C	2,00	19,23	3,48
	4,00	101,1	6,25
	6,00	88,54	9,54
	8,00	60,56	5,88

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram que embora a determinação de glifosato por meio de extração, em pH 4,00 resultasse em maiores concentrações, os teores de glifosato encontrado neste pH foram: 139,1 g L<sup>-1</sup>; 55,89 g L<sup>-1</sup> e 101,1 g L<sup>-1</sup> para as amostras A, B e C, respectivamente, os quais estão muito abaixo quando comparado com o fornecido pelo fabricante (360 g L<sup>-1</sup>).

De acordo com Maniasso<sup>102</sup> os surfactantes, também denominados de tensoativos, são empregados para promover um novo meio reacional ou modificá-lo. Assim, herbicidas contendo surfactante apresentam um meio altamente organizado, justificando desta forma a obtenção de cristais apenas com HCl concentrado. No entanto, a grande quantidade de surfactante presente nas amostras também colaborou para uma precipitação incompleta. Além disso, não há registros, na literatura e/ou no rótulo das embalagens, referente à quantidade de surfactante presente nessas amostras.

A determinação de glifosato nas amostras de herbicidas comerciais também foi realizada diretamente nas amostras e estabelecida diferentes condições de diluição, já que os ambientes micelares são termodinamicamente estáveis e são destruídos pela diluição com



água quando a concentração do surfactante encontra-se abaixo da concentração micelar crítica<sup>102</sup>. Os resultados destes ensaios, bem como seus respectivos desvios padrão relativos (DPR), estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Concentração obtida a partir da diluição das amostras de herbicidas comerciais, em meio ácido, em diferentes pHs.

Amostras	pH	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	DPR (%)
A	2,00	357,2	2,28
	4,00	217,6	1,64
	6,00	153,0	15,2
	8,00	158,9	10,2
B	2,00	281,2	5,03
	4,00	163,0	3,95
	6,00	163,3	6,98
	8,00	123,7	3,87
C	2,00	210,4	9,17
	4,00	127,9	12,9
	6,00	74,36	9,83
	8,00	78,84	1,25

As condições de diluições empregada para a obtenção dos resultados, realizadas em diferentes pHs, mostrou que em meio ácido ocorre a protonação do grupo amina, especialmente em pH 2,00; fornecendo melhores resultados de teores de glifosato. Entretanto, a extração do glifosato neste pH não foi eficiente, provavelmente devido à precipitação incompleta do glifosato.

Os resultados de repetitividade da curva analítica, baseada na equação logarítmica, apresentou linearidade na faixa de 0,0726 a 1,07, correspondente a faixa de  $2,00 \times 10^2$  mg L<sup>-1</sup> a  $2,00 \times 10^3$  mg L<sup>-1</sup>.

Durante a realização deste estudo, observou-se que essa faixa de linearidade da curva analítica bem como altos valores de limite de detecção (184,5 mg L<sup>-1</sup>) e quantificação (220,2 mg L<sup>-1</sup>), não era viável para a aplicação deste método em amostras ambientais. Além

disso, a aplicação do método em amostras de herbicidas comerciais não foi bem sucedida.

Ensaio realizado com *spot tests* empregando aquecimento em estufa, mostrou que houve um aumento da cinética da reação e, com isso, um aumento significativo no sinal analítico. Por isso, neste trabalho, foi realizado novo estudo de otimização das condições experimentais, empregando tempo e temperatura de aquecimento de *spot tests*, com o intuito de melhorar a sensibilidade do método proposto, devido ao aumento da cinética da reação, e sua aplicação em amostras comerciais com melhores resultados de quantificação e em amostras de interesse ambiental.

## 6.3 – PARTE EXPERIMENTAL EMPREGANDO NOVAS CONDIÇÕES DE TRABALHO

### 6.3.1 – Soluções Padrão de Glifosato

A avaliação da estabilidade óptica, estudo de íons interferentes e planejamento experimental, realizado para a obtenção das condições ótimas de aquecimento, foram feitos utilizando concentração de solução padrão de glifosato de  $2,00 \times 10^2 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta solução foi preparada a partir de diluição adequada da solução padrão estoque de  $2,04 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ , para a qual pesou 0,0204 g de glifosato padrão e diluída com água purificada no sistema de Milli-Q para 10,00 mL.

Para a obtenção da curva analítica, as soluções-padrão de trabalho utilizadas na determinação de glifosato foram preparadas mediante diluições adequadas da solução-estoque de  $2,04 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$  para a obtenção das seguintes soluções de concentrações finais de:  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $150 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $220 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $300 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $400 \text{ mg L}^{-1}$  e  $500 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 6.3.2 – Solução de *p*-DAC (0,142 % m/v) em HAc ( $4,00 \text{ mol L}^{-1}$ )

Para o preparo desta solução, pesou-se 0,0142 g de *p*-DAC e transferiu-se para um balão de 10,00 mL, em seguida adicionou-se 5,20 mL de HAc padronizado ( $7,70 \text{ mol L}^{-1}$ ). Em todos os ensaios realizados, as medidas foram feitas em replicatas ( $n = 3$ ), e esta solução preparada diariamente.

### 6.3.3 – Preparo dos *Spot Tests*

Os *spot tests* foram feitos conforme descrito no item 6.1.4, e em seguida, os mesmos foram colocados em estufa por um período de 8 minutos à temperatura de 45 °C.

### 6.3.4 – Otimização das Variáveis Envolvidas na Etapa de Aquecimento dos *Spot Tests*

Para melhorar a sensibilidade da reação foi inserido ao procedimento a etapa de aquecimento dos *spot tests*. Desta forma, foi feita a otimização das condições de aquecimento empregando o planejamento composto central<sup>96</sup>. As variáveis estudadas foram temperatura e tempo codificados em níveis, conforme apresentada na Tabela 12.

**Tabela 12.** Níveis estabelecidos no planejamento experimental para as variáveis tempo e temperatura de aquecimento.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+ 1	+ 1,41
Temperatura (°C)	30	34	45	56	60
Tempo (minutos)	5	6	8	10	11

As condições de aquecimento foram selecionadas de acordo com testes preliminares, para a confecção da matriz de experimento. A matriz experimental, de 13 ensaios, empregada está descrita na Tabela 13.

**Tabela 13.** Matriz utilizada para a obtenção das condições ótimas de aquecimento dos *spot tests*.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	A <sub>R</sub> (495 nm)	DPR (%)
1	34	6	0,223	9,2
2	56	6	0,252	9,9
3	34	10	0,152	8,3
4	56	10	0,231	3,8
5	30	8	0,0930	2,8
6	60	8	0,212	8,5
7	45	5	0,178	7,2
8	45	11	0,171	5,6
9	45	8	0,203	4,6
10	45	8	0,175	9,7
11	45	8	0,145	5,3
12	45	8	0,203	4,6
13	45	8	0,197	6,5

### 6.3.5 – Estudo da Estabilidade do Produto Reacional

A avaliação da estabilidade do produto colorido, empregando a nova metodologia de trabalho, foi realizada conforme descrita no item 6.1.5.4.

### 6.3.6 – Estudo de Íons Interferentes

#### 6.3.6.1 – Formulações comerciais

A possível interferência de alguns ingredientes, coprodutos de síntese ou adulterantes, que podem estar nas formulações comerciais foi estudada. Mesmo havendo regulamentos para a comercialização dessas formulações, os produtores não são obrigados a especificar no rótulo do produto a lista de ingredientes inertes.

Dentre os interferentes, foi estudado a influência de N-nitrosoglifosato, isopropilamina, polioxietileno de alquilamina, glufosinato<sup>33</sup>, na faixa de concentração de 0,500 mg L<sup>-1</sup> a 2,00 mg L<sup>-1</sup> e formaldeído, na faixa de 150 mg L<sup>-1</sup> a 320 mg L<sup>-1</sup> à solução padrão de glifosato contendo 200 mg L<sup>-1</sup>.

#### 6.3.6.2 – Amostras de águas naturais

O estudo dos íons interferentes, em amostras de água<sup>33,38</sup>, foi feito adicionando concentrações diferentes deste à solução padrão de glifosato (2,00 x 10<sup>2</sup> mg L<sup>-1</sup>). O cátion Cu<sup>2+</sup> foi estudado na faixa de concentração de 5,00 mg L<sup>-1</sup> a 1,00 x 10<sup>3</sup> mg L<sup>-1</sup>. Já os cátions Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> e Zn<sup>2+</sup> e os ânions SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub><sup>3-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram estudados na faixa de concentração de 150 mg L<sup>-1</sup> a 1,00 x 10<sup>3</sup> mg L<sup>-1</sup>.

#### 6.3.7 – Preparo das Amostras para Análise

##### 6.3.7.1 – Preparo das amostras de herbicidas

O preparo das amostras de herbicidas consistiu, apenas, em diluições sucessivas para a obtenção de uma solução de concentração final de 100 mg L<sup>-1</sup> de glifosato a partir da solução de herbicida original.

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de concentração de 3,60 g L<sup>-1</sup>, tomando-se alíquota de 0,500 mL da amostra de herbicida e diluída para 50,00 mL. Em seguida, 1,400 mL desta solução foi transferida para balão de 50,00 mL e completou-se o volume da solução com água deionizada, após a correção de pH para 2,00 com solução padronizada de HCl de concentração de 1,00 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida foram analisadas pelo procedimento recomendado (item 6.3.3).

### 6.3.7.2 – Preparo das amostras ambientais

As amostras de águas elencadas foram coletadas em diferentes rios das cidades de Araraquara (A) e Catanduva (B, C e D) localizadas no estado de São Paulo.

Inicialmente, foi feita a análise físico-química das amostras por profissionais especializados e os parâmetros obtidos para duas amostras representativas estão apresentados no Anexo 3.

Para a aplicação da espectroscopia de reflectância difusa, conforme a necessidade, as amostras de água foram filtradas à vácuo, utilizando membrana com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ , para a eliminação de sólidos em suspensão e estocadas em refrigerador à temperatura de 4 °C em frascos de polietileno.

Como resultados dos teores de glifosato obtidos nas amostras de água apresentaram-se abaixo do limite de detecção (7,3  $\text{mg L}^{-1}$ ), as amostras de água foram fortificadas com 75  $\text{mg L}^{-1}$ , 150  $\text{mg L}^{-1}$ , 225  $\text{mg L}^{-1}$  e 300  $\text{mg L}^{-1}$  de solução padrão de glifosato.

Para estas amostras foi necessária a utilização da etapa de pré-tratamento empregando extração em fase sólida, por causa da influência do efeito de matriz, devido à presença de íons interferentes. O pré-tratamento das amostras de águas foi feito de acordo com Hanke, Singer e Hollender<sup>60</sup>, conforme descrito a seguir:

Para o preparo da fase estacionária, aproximadamente, 0,7505 g de Strata-X foi empacotado em uma coluna de vidro, com diâmetro de 1,0 cm e altura de 20 cm. O sorbente (Strata-X) foi condicionado com 10,00 mL de metanol e em seguida com 5,00 mL de ácido fórmico (0,100 % v/v). Alíquotas de 1,00 mL das amostras de águas fortificadas, foram introduzidas na coluna e, em seguida, adicionado 1,00 mL de diclorometano e extraído a uma vazão de, aproximadamente, 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Após a remoção dos componentes da amostra (interferentes) pelo procedimento de extração adotado, os analitos foram eluídos com 10,00 mL de metanol diluído na proporção 4:6 (MeOH/H<sub>2</sub>O). Os extratos foram coletados em frascos de vidro e os volumes foram reduzidos para aproximadamente 0,70 mL em banho de aquecimento à temperatura de 70 °C. Os extratos foram coletados à temperatura ambiente, transferidos balões volumétricos de 1,00 mL, diluídos com água deionizada e, em seguida, as amostras foram analisadas conforme o procedimento recomendado (item 6.3.3).

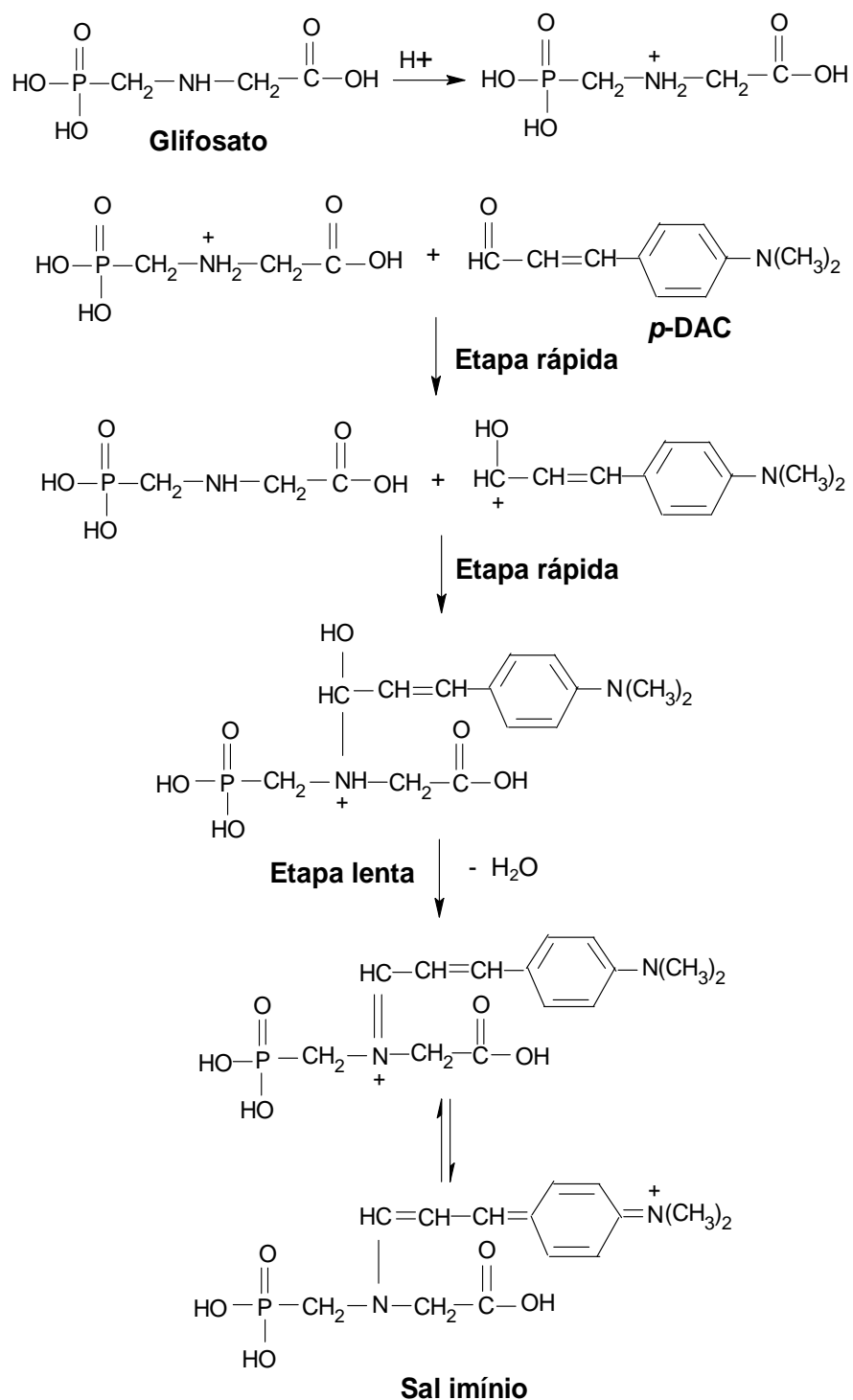
### 6.3.7.3 – Preparo das amostras de águas pura e minerais

Amostra de água destilada utilizada neste experimento foi obtida em nosso laboratório. As águas minerais foram adquiridas em lojas comerciais da cidade de Araraquara (SP). Aproximadamente, 200,00 mL dessas amostras de águas foram fortificadas com alíquotas adequadas (0,320 mL) da solução estoque para a obtenção da concentração final de 0,40 mg L<sup>-1</sup> de glifosato. As amostras foram transferidas para um sistema de destilação simples e evaporadas, à temperatura de, aproximadamente, 100 °C. Esta temperatura foi utilizada porque a decomposição do glifosato ocorre em temperaturas acima de 170 °C. Em seguida, foram resfriadas e filtradas, sendo o pH ajustado para aproximadamente 2,50. Devido à quantidade de solução obtida, as amostras foram evaporadas novamente em placas de aquecimento, para uma maior pré-concentração e após o resfriamento as soluções foram transferidas para balões de 1,0 mL e em seguida analisadas pelo procedimento recomendado (item 6.3.3).

## 6.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS DADOS ALCANÇADOS

A reação entre amina primária ou secundária e *p*-DAC ocorre via condensação do grupo amino protonado do glifosato com o grupo carbonila do reagente, para produzir um sal imínio.

O mecanismo provável desta reação está apresentado na Figura 27, o qual se baseia em modelos de reações sugeridas na literatura<sup>95,103,104</sup>.

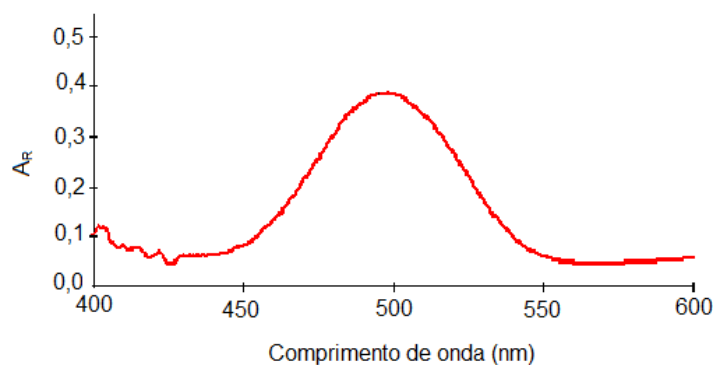


**Figura 27.** Esquema do mecanismo de reação entre glifosato e *p*-DAC.

**Fontes:** Gotardo *et al.*<sup>95</sup>, Zawilla<sup>103</sup> e Saeed, Haque e Quresh<sup>104</sup>.



As medidas de reflectância difusa foram feitas em 495 nm (Figura 28) à temperatura ambiente (25 °C).



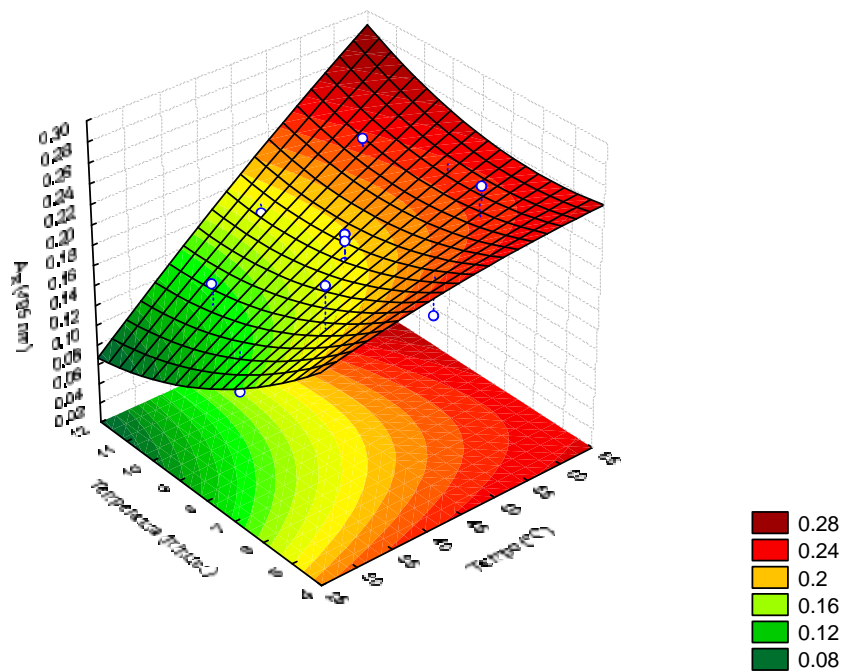
**Figura 28.** Espectro obtido, em *spot test*, do produto da reação entre glifosato (200 mg L<sup>-1</sup>) e *p*-DAC, em meio de HAc, empregando aquecimento.

O aquecimento dos *spot tests* em estufa, à temperatura controlada, melhorou consideravelmente o sinal de reflectância difusa ( $A_R$ ) obtido com a reação entre glifosato e *p*-DAC, em meio de ácido acético, devido ao aumento da cinética da reação.

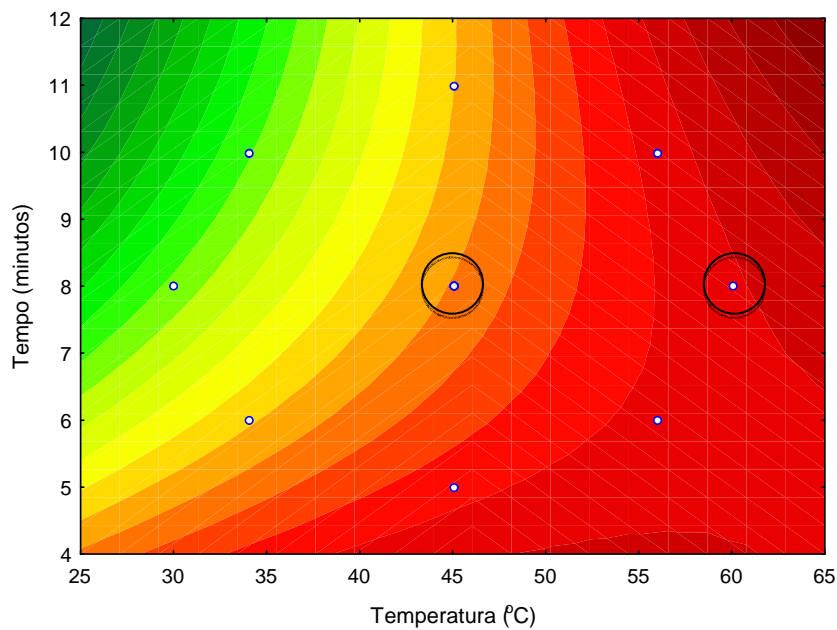
De acordo com a Figura 28, medida de reflectância difusa realizada com solução padrão de glifosato de 200 mg L<sup>-1</sup> apresentou sinal analítico de 0,4080. A partir destes dados foi realizada uma nova otimização das condições experimentais envolvendo as variáveis de aquecimento dos *spot tests*, para a determinação de glifosato por espectroscopia de reflectância difusa, através do planejamento composto central.

#### 6.4.1 – Otimização das Condições Experimentais

As variáveis, tempo e temperatura de aquecimento, foram estudados em cinco níveis (+1,41, +1, 0, -1 e -1,41) e os resultados obtidos estão mostrados nas Figuras 29 e 30.



**Figura 29.** Gráfico da superfície de resposta das variáveis tempo e temperatura de aquecimento, empregando concentração de glifosato  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , *p*-DAC 0,142 % e HAc  $4,09 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 30.** Curva de nível da superfície de resposta referente à Figura 29.

Os gráficos apresentados nas Figuras 29 e 30 mostram que a região de cor vermelha apresenta sinal analítico de melhor resposta, devido ao valor de reflectância difusa máximo encontrado, de acordo com as condições em que as variáveis foram estudadas.

A Equação 7 é a equação matemática obtida pelo programa computacional (*Statistica*, versão 6.0) utilizado para a obtenção dos gráficos apresentados nas Figuras 29 e 30, conforme descrito no item 6.2.1.

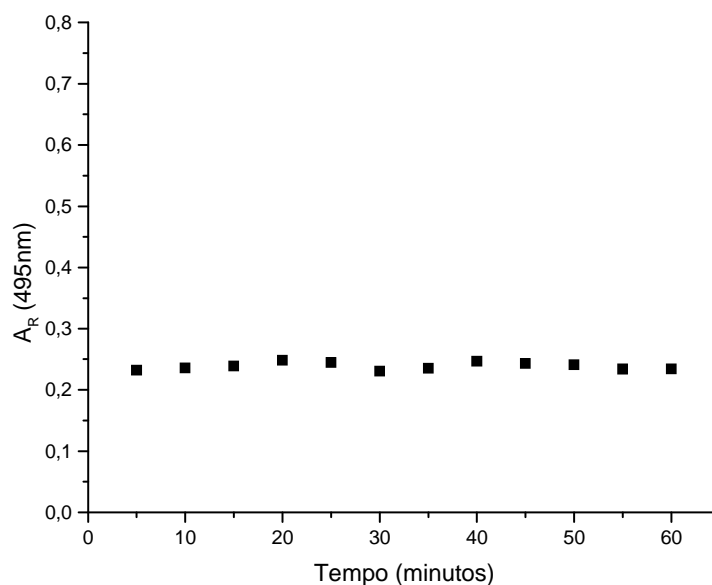
$$Z = 0,35325 + 0,00022 x - 0,00002 x^2 - 0,05518 y + 0,00145 y^2 + 0,00057 xy \quad (7)$$

Devido à obtenção da região ótima para a variável tempo de aquecimento de 8 minutos, foram realizados ensaios empregando *spot tests* às temperaturas de 45 °C e 60 °C, os quais apresentaram com valores de reflectância difusa de 0,2316 e 0,1818 ( $n = 3$ ), respectivamente.

Embora o gráfico de superfície de resposta (Figura 29) tenha apresentado uma tendência na utilização de temperaturas maiores que 60 °C para a obtenção de maiores valores de  $A_R$ , esta condição não foi possível devido à carbonização do papel que ocorre em temperaturas acima de 78 °C. Desta forma, as condições de aquecimento foram fixadas em 45 °C para a variável temperatura e 8 minutos para a variável tempo, pois o valor de  $A_R$  obtido, empregando estas condições experimentais, foi satisfatório para a espectroscopia de reflectância difusa.

#### 6.4.2 – Estudo da Estabilidade do Produto Reacional

A estabilidade óptica do produto reacional entre glifosato e *p*-DAC, em meio de ácido acético, empregando aquecimento dos *spot tests* em estufa, à temperatura controlada, também foram estudadas e os resultados das medidas de reflectância difusa estão apresentados na Figura 31.



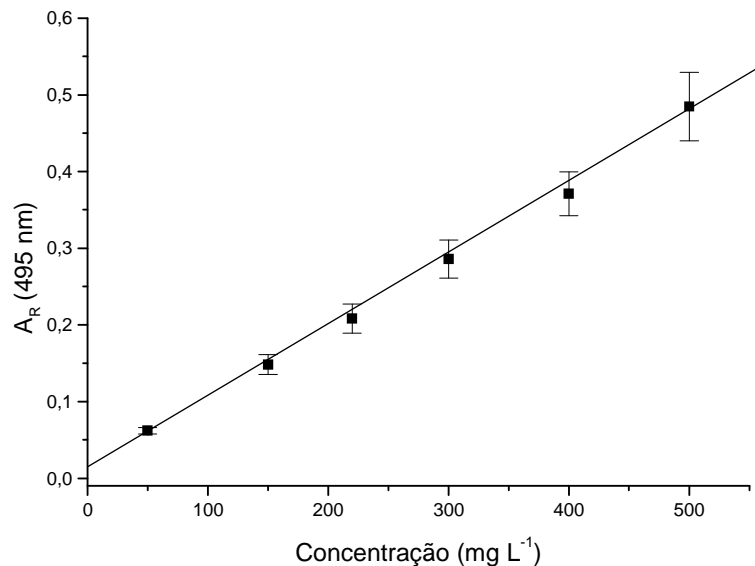
**Figura 31.** Estabilidade do produto reacional entre glifosato ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *p*-DAC (0,142%) em HAc ( $4,00 \text{ mol L}^{-1}$ ) com aquecimento em estufa por 8 minutos à  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A Figura 31 apresenta a estabilidade da reação entre glifosato ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *p*-DAC (0,142 %), em HAc ( $4,00 \text{ mol L}^{-1}$ ), empregando aquecimento em estufa por 8 minutos à temperatura de  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , condições otimizadas por planejamento de superfície de resposta.

Os resultados obtidos indicam que as medidas podem ser realizadas no intervalo de 5 a 60 minutos, pois a variabilidade entre estas medidas não apresentam diferença significativa.

#### 6.4.3 – Curva Analítica e Validação do Método

A curva analítica empregada para a análise de glifosato em amostras de herbicidas comerciais (A, B, C) e amostras de águas variou na faixa de  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$  a  $500 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 32).



**Figura 32.** Curva analítica obtida para a determinação de glifosato na faixa de concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> a 500 mg L<sup>-1</sup> e seus respectivos desvios (n = 3), empregando espectroscopia de reflectância difusa.

A curva analítica (Figura 32) usada nas determinações de glifosato apresentou boa repetitividade e um bom coeficiente de correlação linear ( $R = 0,999$ ), apesar da ampla faixa de concentração estabelecida.

A Tabela 14 apresenta os novos parâmetros experimentais bem com os novos dados das figuras de mérito encontrado.

**Tabela 14.** Parâmetros instrumentais e figuras de mérito obtidas por espectroscopia de reflectância difusa, com aquecimento dos *spot tests* em estufa por 8 minutos à 45 °C.

Parâmetros	
Temperatura de aquecimento	45 °C
Tempo de aquecimento	8 minutos
Faixa linear de trabalho	50,0 mg L <sup>-1</sup> a 500 mg L <sup>-1</sup>
Equação da reta	$A_R = 0,008880 + 9,299 \times 10^{-4} \times C$
Coefficiente de correlação linear	0,999
Limite de detecção	7,3 mg L <sup>-1</sup>
Limite de quantificação	21,9 mg L <sup>-1</sup>
Repetibilidade intra-dia	150 ± 6,9 mg L <sup>-1</sup>
Repetibilidade inter-dia	150 ± 7,4 mg L <sup>-1</sup>

O aquecimento dos *spot tests* em estufa, à temperatura controlada, melhorou consideravelmente a sensibilidade do método proposto, devido ao aumento da cinética da reação e estabilidade do produto da reação entre glifosato e *p*-DAC, em meio de ácido acético.

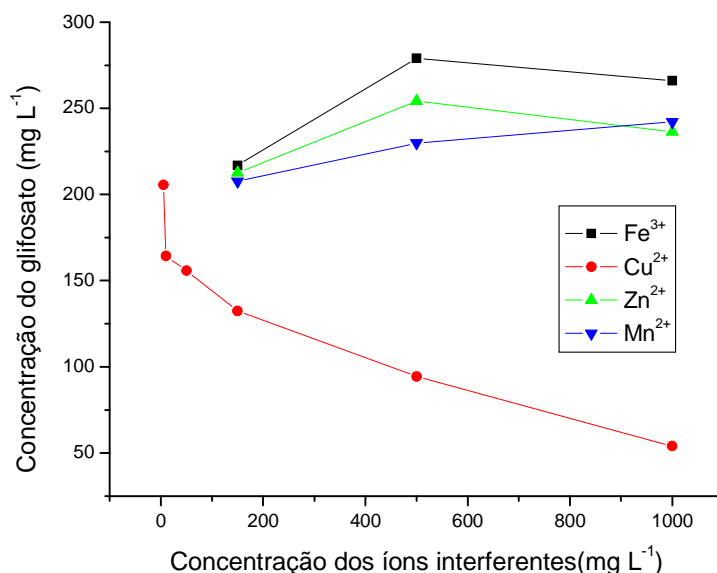
Comparando os limites de detecção e os limites de quantificação pelo método proposto, utilizando ou não a etapa de secagem dos *spot tests* em estufa à 45 °C (Tabelas 9 e 14), estes foram significativamente menores empregando a etapa de secagem. Além disso, foi possível a obtenção de manchas mais homogêneas e isso favoreceu a obtenção de bons resultados de repetibilidade, com baixos valores de desvios.

#### 6.4.4 – Estudo dos Íons Interferentes

A possível interferência de vários cátions (Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> e Zn<sup>2+</sup>) e ânions (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub><sup>3-</sup>), N-nitrosoglifosato, glufosinato, polioxietileno amina, isopropilamina e formaldeído foram avaliados<sup>33,38</sup>. Neste estudo, soluções contendo 200 mg L<sup>-1</sup> de glifosato e cada uma das espécies interferentes foram feitas separadamente em diferentes faixa de concentração, estabelecida de acordo com a literatura<sup>38</sup> e analisadas de acordo com o procedimento recomendado (item 6.3.3).

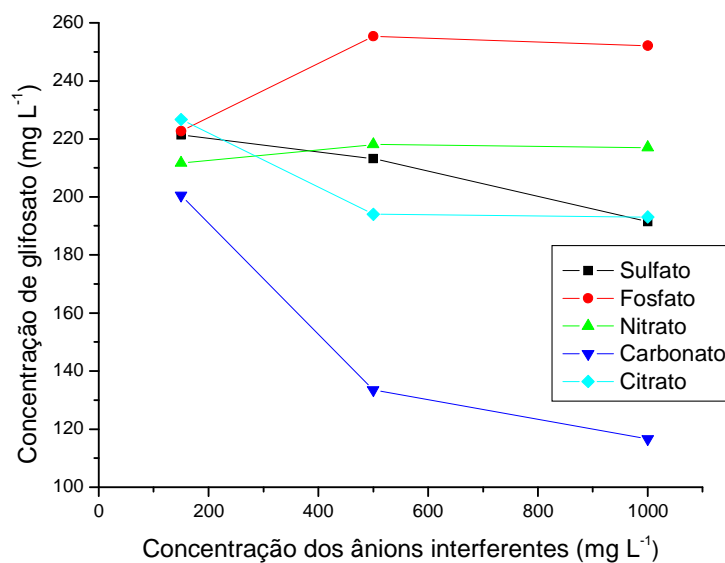
Neste estudo, o limite de erro estabelecido foi de 3% e os resultados obtidos mostraram que N-nitrosoglifosato, glufosinato, polioxietileno amina, isopropilamina e formaldeído não apresentaram influência significativa no sinal analítico, pois estes compostos não apresentaram erro maior que 3 % na determinação de glifosato.

Os resultados obtidos com os cátions estudados mostra que o íon  $\text{Cu}^{2+}$  pode interferir na reação se presente em concentrações maiores que  $10,2 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto que os íons  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  podem interferir em concentração maior que  $150 \text{ mg L}^{-1}$ . Já o íon  $\text{Zn}^{2+}$ , na faixa de concentração estudada, não apresenta influencia significativa no sinal analítico (Figura 33).



**Figura 33.** Efeito de cátions interferentes empregando espectroscopia de reflectância difusa.

Dentre os ânions estudados apenas os íons  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$  podem interferir no sinal analítico se presentes em concentrações maiores que  $150 \text{ mg L}^{-1}$ . Já o íon  $\text{SO}_4^{2-}$  pode interferir em concentrações maiores que  $500 \text{ mg L}^{-1}$  enquanto que o íon  $\text{NO}_3^-$  não apresenta influencia no sinal analítico na faixa de concentração estudada.



**Figura 34.** Efeito de ânions interferentes empregando espectroscopia de reflectância difusa.

A Tabela 15 apresenta os limites toleráveis para as concentrações das espécies interferentes estudadas que causam erros de  $\pm 3\%$ , na determinação de glifosato empregando espectroscopia de reflectância difusa.

**Tabela 15.** Efeito das espécies interferentes em amostras de águas e amostras de herbicidas comerciais contendo  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de solução padrão de glifosato.

Espécies interferentes	Concentração máxima das espécies sem efeito de matriz ( $\text{mg L}^{-1}$ ) *
N-nitrosoglifosato, glufosinato, polioxietileno amina, isopropilamina, formaldeído, $\text{NO}_3^-$ e $\text{Zn}^{2+}$	$1000 \text{ mg L}^{-1}$
$\text{SO}_4^{2-}$	$500 \text{ mg L}^{-1}$
$\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{CO}_3^{2-}$ , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ e	$150 \text{ mg L}^{-1}$
$\text{Cu}^{2+}$	$10,2 \text{ mg L}^{-1}$

\* Limite de concentração causado pelo erro de  $\pm 3\%$  de desvio.



De acordo com a Tabela 15, dentre os cátions estudados o que apresentou maior efeito de interferência foi o íon  $\text{Cu}^{2+}$ . A presença de íons cobre em amostras de água pode favorecer a formação de complexos entre este íon e a molécula de glifosato<sup>33</sup>. Desta forma, quanto maior a concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na solução menor é a disponibilidade da molécula de glifosato para reagir com o *p*-DAC, havendo, portanto, diminuição do sinal analítico.

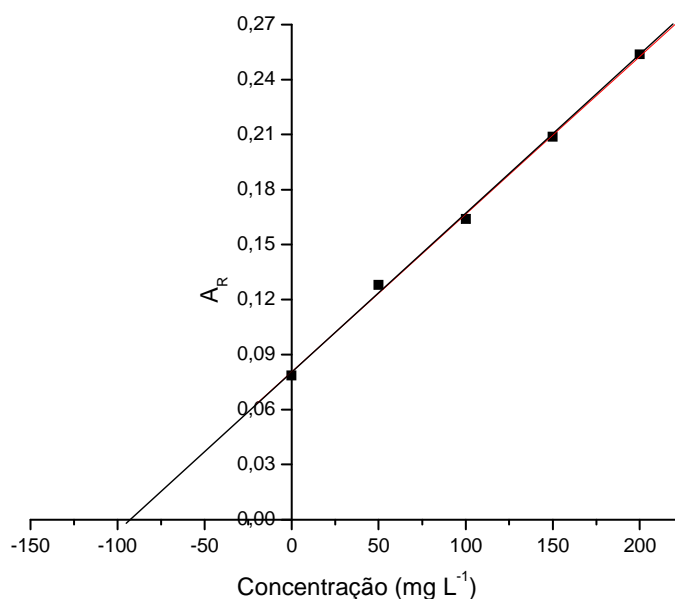
#### 6.4.5 – Aplicação do Método Proposto

A determinação de glifosato em amostra de herbicidas comerciais foi realizada empregando método de adição de padrão e recuperação, por não ser possível a quantificação de glifosato nestas amostras empregando a curva analítica devido ao efeito de matriz.

Na amostra A, a concentração de solução padrão de glifosato adicionado foi na faixa de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  a  $200 \text{ mg L}^{-1}$ . Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 16 e na Figura 35, para exemplificar a obtenção dos resultados das demais amostras estudadas.

**Tabela 16.** Concentração e valores de reflectância difusa obtidos na determinação de glifosato nas amostras de herbicidas comerciais e os respectivos desvio padrão relativo (DPR,  $n = 3$ ).

Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$A_R$	DPR (%)
0	0,07867	8,5
50	0,1282	9,9
100	0,1640	4,8
150	0,2087	8,2
200	0,2537	6,1



**Figura 35.** Determinação de glifosato na amostra A por adição de padrão e recuperação.

Os teores de glifosato obtido foram: 377,7 g L<sup>-1</sup> para amostra A; 361,4 g L<sup>-1</sup> para amostra B e 368,9 g L<sup>-1</sup> para amostra C, com desvio padrão relativo (n = 3) de 4,6 %; 5,4 % e 4,8 %, respectivamente. Estes resultados foram considerados satisfatórios porque os teores de glifosato encontrados nas amostras de herbicidas estudadas estão concordantes com o teor declarado pelo fabricante e com baixos valores de desvios.

Para avaliar a exatidão do método, ensaios de adição de padrão e recuperação foram realizados. Nessas amostras de herbicidas, a concentração de solução padrão de glifosato adicionados foram de 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 150 mg L<sup>-1</sup>, e 200 mg L<sup>-1</sup> para as amostras A e B, e 40 mg L<sup>-1</sup>, 80 mg L<sup>-1</sup>, 120 mg L<sup>-1</sup>, e 160 mg L<sup>-1</sup> para a amostra C. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 17.

**Tabela 17.** Resultados de recuperação obtidos em amostras de herbicidas comerciais.

Amostras	Concentração adicionada	Concentração recuperada <sup>1</sup>	Recuperação
	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(%)
A	50	48,06	96,1
	100	93,16	93,2
	150	142,8	95,2
	200	188,2	94,1
B	50	51,09	102
	100	101,5	102
	150	149,8	99,9
	200	192,5	96,3
C	40	39,46	98,7
	80	79,26	99,1
	120	123,1	103
	160	162,1	101

<sup>1</sup>Média dos teores encontrados de três análises independentes (n = 3).

O método proposto foi considerado exato devido à faixa de recuperação obtida, 93,2 a 103 % para as amostras de herbicidas comerciais. Esses dados indicam que a presença de íons ou moléculas presentes na matriz não apresenta influência no sinal analítico. Desta forma, apenas o fator de diluição empregado foi satisfatório no preparo das amostras para a determinação de glifosato, não sendo, portanto, necessárias etapas de pré-tratamento.

O método proposto também foi utilizado na determinação de glifosato em amostras de águas de rio, isentas de glifosato, as quais foram fortificadas por adição de padrão, seguida de *clean-up*, empregando extração em fase sólida e quantificadas pelo método de adição de padrão e recuperação. Assim a aplicação do método proposto foi realizado ensaios de adição de padrão e recuperação nas concentrações de 75 mg L<sup>-1</sup>, 150 mg L<sup>-1</sup>, 225 mg L<sup>-1</sup>, e 300 mg L<sup>-1</sup> de solução padrão de glifosato. Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Resultados de recuperação obtidos em amostras de águas de rio, após o pré-tratamento empregando extração em fase sólida.

Amostras	Concentração adicionada (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração recuperada <sup>1</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
A	75	72,51	96,7
	150	154,6	102
	225	226,7	101
	300	296,2	98,7
B	75	77,91	102
	150	160,4	103
	225	218,8	97,2
	300	287,3	95,7
C	75	72,20	96,3
	150	156,1	101
	225	223,8	99,5
	300	282,6	94,2
D	75	74,37	99,2
	150	148,5	99,0
	225	214,3	95,2
	300	295,9	98,6

<sup>1</sup>Média dos teores encontrados de três análises independentes (n = 3).

A complexidade das amostras ambientais (águas de rio), devido à presença de alguns íons metálicos ou ânions, grupos aminas e substâncias húmicas, podem interferir nos resultados das análises.

Neste trabalho, a utilização de pré-tratamento empregando extração em fase sólida, foi necessária para *clean-up* das amostras de águas estudadas e com isso a eliminação de substâncias interferentes presentes na matriz. Os valores do ensaio de recuperação obtidos foram na faixa de 94,2 a 103 % de glifosato nas amostras de água de rio, após a etapa de pré-tratamento (Tabela 18).

Outro estudo realizado neste trabalho, para avaliar eficiência do método proposto, foi o emprego de etapas de pré-concentração em amostras de água que apresentam baixas concentrações de glifosato. Neste estudo, três amostras de água (água pura e águas minerais), livres de glifosato, foram fortificadas com  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $0,40 \text{ mg L}^{-1}$ ) e pré-concentradas. Os resultados obtidos com o ensaio de recuperação estão apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19.** Resultados de recuperação de glifosato obtidos em amostras de água pura e mineral e seus respectivos desvio padrão relativo (DPR,  $n = 3$ ).

Amostras	Concentração adicionada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentração recuperada <sup>1</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)	DPR (%)
A (água destilada)	400	395,6	98,9	5,3
B (água mineral)	400	365,2	91,3	4,2
C (água mineral)	400	368,8	91,2	3,8

Os resultados obtidos em amostras de água pura e de consumo humano quando fortificadas com  $0,40 \text{ mg L}^{-1}$  e pré-concentradas 200 vezes (Tabela 19) apresentou bons resultados de recuperação e baixos valores de desvio padrão relativo ( $< 6\%$ ).

Comparando a sensibilidade com o método oficial<sup>69</sup>, verifica-se que a utilização da espectroscopia de reflectância difusa, em amostras de água contendo resíduo de glifosato, apresentou boa sensibilidade, pois embora tenha obtido limite de detecção  $7,3 \text{ mg L}^{-1}$  e limite de quantificação de  $21,9 \text{ mg L}^{-1}$ , os resultados obtidos pelo método proposto, conforme apresentado na Tabela 19, indicam que o glifosato pode ser detectado e quantificado em baixos níveis, quando a amostra é submetida à etapa de pré-concentração.

## 6.5 – CONCLUSÃO

Desta forma, a espectroscopia de reflectância difusa pode ser considerada um método alternativo na determinação de glifosato em amostras de água, bem como nas amostras de herbicidas comerciais, devido à obtenção de resultados bastante satisfatórios e por ser uma técnica promissora em análise quantitativa para o monitoramento de herbicidas comerciais contendo glifosato como ingrediente ativo.

Adicionalmente, os métodos espectrofotométricos reportados na literatura apresentam como desvantagens a utilização de reagentes e solventes tóxicos como dissulfeto de carbono em meio de clorofórmio<sup>75</sup>, a necessidade de aquecimento a 100°C para a promoção da reação<sup>38</sup> aliado a falta de reprodutibilidade.

Além disso, o método proposto está em consonância com os preceitos da Química Verde, já que é um método de análise que não faz uso de reagentes tóxicos, envolve grande economia de reagentes e tempo e, conseqüentemente, a minimização de geração de resíduos.

## 7 – MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

A espectrofotometria de absorção molecular é uma técnica muito utilizada no desenvolvimento de métodos analíticos, em diversas áreas do conhecimento, devido à simplicidade de operação, robustez e custo relativamente baixo<sup>74</sup>.

Esta técnica permite que cada espécie, iônica ou molecular, seja capaz de absorver radiação eletromagnética, e de acordo com as características do pico de absorção e ser correlacionado com o tipo de ligação existente na espécie de interesse, pois embora os espectros eletrônicos moleculares sejam mais complexos em relação aos espectros iônicos, devido à superposição de transições vibracionais com transições eletrônicas, ambos espectros (iônico e molecular) fornecem informações qualitativas sobre a espécie em questão<sup>105</sup>.

Em se tratando de absorção de radiação em nível molecular (200 nm a 760 nm), esse fenômeno transfere energia para a molécula, resultando em um decréscimo na intensidade da radiação incidente, devido à absorção<sup>93</sup>. Dessa forma, há uma absorção do feixe de radiação, fundamentada na lei da absorção conhecida como Lei de Lambert-Beer<sup>74</sup>, que nos diz que a intensidade da luz transmitida diminui exponencialmente quando a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente<sup>93,105</sup>.

As medidas de absorção podem ser feitas para amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões do ultravioleta (UV), visível (Vis) e infravermelho (IV) do espectro eletromagnético. Devido vários compostos orgânicos absorverem na região do ultravioleta-visível, em geral, a sensibilidade e seletividade de alguns compostos, é determinada, empregando a espectroscopia de absorção molecular, a partir da incorporação de reagentes cromogênicos à molécula de interesse<sup>74</sup>.

Atualmente, existem inovações para melhorar a eficiência na aplicação da espectrofotometria. Estas inovações consistem em estratégias para o aumento da sensibilidade, tais como a utilização de reagentes que levam a produtos com maior absorvidade, aumento do caminho óptico, dentre outros.

De acordo com a lei de Lambert-Beer<sup>105</sup>, isto se deve ao fato de que, quanto mais longo for o comprimento do caminho do meio através do qual a luz passa (caminho óptico), mais centros absorventes estarão no caminho. Também, para um dado caminho óptico, quanto maior for a concentração de absorventes, mais forte será a atenuação do sinal analítico.

Essas estratégias, segundo Rocha e Teixeira<sup>74</sup>, visam à ampliação da faixa de concentração útil para análise bem como quantificação de alguns compostos orgânicos em níveis traços (< 1%)<sup>93</sup>.

Para o desenvolvimento deste trabalho, empregou-se a espectroscopia de absorção molecular, baseada em medida de absorção na região do UV-Vis, para a determinação direta de glifosato. Neste estudo, as reações empregadas foram entre glifosato e *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC), em meio acidificado, e entre glifosato e ninidrina, na presença de molibdato de sódio, os quais apresentam máximo de absorção em 495 nm e em 570 nm, respectivamente.

## 7.1 – EMPREGANDO A REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO E *p*-DAC

### 7.1.1 – Parte Experimental

#### 7.1.1.1 – Materiais e equipamentos

- ✓ Sistema de purificação de água da marca Milli-Q, modelo Millipore, RO15, foi utilizado na purificação da água (18 MΩ cm) empregada no preparo de soluções.
- ✓ Micropipetas da marca Brand (100-1000 µL e 10-100 µL), foram utilizadas para medir o volume das soluções.
- ✓ Balança analítica AG204 da marca Mettler Toledo, foi utilizada na pesagem das amostras e reagente.
- ✓ Espectrofotômetro Labspere RSA 8453 da marca Hewlett Packard, de feixe único com lâmpadas de tungstênio e deutério e com detector de arranjo de diodos, foi utilizado nas medidas analíticas.

#### 7.1.1.2 – Reagentes

- ✓ Glifosato (Sigma-Aldrich, 96 %)
- ✓ *p*-Dimetilaminocinamaldeído (Aldrich, 98 %)
- ✓ Ácido acético glacial (Merck, 99 %)



### 7.1.1.3 – Preparo das soluções

#### 7.1.1.3.1 – Solução-padrão estoque de glifosato ( $504 \text{ mg L}^{-1}$ )

Esta solução foi feita a partir da pesagem de 0,0504 g de glifosato (padrão), e este em seguida, dissolvido e transferido, quantitativamente, em água deionizada para um balão volumétrico de 100,00 mL e completado o volume.

#### 7.1.1.3.2 – Solução estoque de ácido acético ( $6,000 \text{ mol L}^{-1}$ )

Para o preparo desta solução, alíquota de 85,91 mL da solução de ácido acético concentrado ( $17,46 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi transferida para balão volumétrico de 250,00 mL, contendo água deionizada e completado o volume. Em seguida, esta solução foi devidamente diluída para padronização com uma solução de NaOH recém padronizada com biftalato de potássio ( $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ), conforme descrito no item 6.1.3.2.

### 7.1.1.4 – Metodologia empregada

Ensaio iniciais foram realizados com *p*-DAC 0,035% em meio acidificado, empregando ácido acético ( $6,000 \text{ mol L}^{-1}$ ) e glifosato ( $101 \text{ mg L}^{-1}$ ), com a utilização do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) e sem este surfactante no meio reacional. Esta solução foi preparada a partir da pesagem de 0,0035 g de *p*-DAC, dissolvido em 3,44 mL ácido acético ( $6,000 \text{ mol L}^{-1}$ ). Esta solução foi transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico de 10,00 mL e, em seguida, adicionou-se 2,00 mL de solução padrão de glifosato estoque ( $504 \text{ mg L}^{-1}$ ). Após a obtenção da solução de trabalho, a absorvância da solução foi medida em um espectrofotômetro contra uma solução de branco contendo apenas o reagente cromogênico (*p*-DAC em HAc) nas mesmas condições.

### 7.1.1.5 – Otimização das condições experimentais

A otimização das condições analíticas, para aplicação do método proposto à determinação de glifosato, foi feita por meio de análise quimiométrica, empregando planejamento composto central para a obtenção da superfície de resposta. As variáveis envolvidas na reação foram: concentração de *p*-DAC (%) e concentração de HAc ( $\text{mol L}^{-1}$ ),

sendo estas estudadas em cinco níveis (-1,41; -1; 0; +1 e +1,41), conforme descrito na Tabela 20.

**Tabela 20.** Níveis estabelecidos no planejamento experimental para detecção do glifosato 495 nm.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+ 1	+ 1,41
<i>Cp</i> -DAC (% m/v)	0,0101	0,0131	0,0202	0,0273	0,0303
CHAc (mol L <sup>-1</sup> )	2,49	3,19	5,00	6,80	7,50

As concentrações de *p*-DAC e HAc foram selecionadas de acordo com testes preliminares para a confecção da matriz de experimento. Para a realização deste planejamento foram feitas combinações de diferentes níveis perfazendo um total de doze ensaios, os quais estão apresentados na Tabela 21.

**Tabela 21.** Matriz experimental empregando detecção espectrofotométrica com os valores de absorbância (495 nm) e os respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3).

Ensaios	CHAc (mol L <sup>-1</sup> )	<i>Cp</i> -DAC (% m/v)	Abs (495nm)	DPR (%)
1	3,19	0,0131	0,701	1,7
2	6,80	0,0131	0,942	2,6
3	3,19	0,0273	1,84	0,79
4	6,80	0,0273	2,28	0,65
5	5,00	0,0202	1,44	1,9
6	5,00	0,0202	1,41	2,8
7	5,00	0,0202	1,37	0,70
8	5,00	0,0202	1,38	1,9
9	2,49	0,0202	1,11	13
10	7,50	0,0202	1,52	1,8
11	5,00	0,0101	0,677	2,9
12	5,00	0,0303	2,05	3,3

Para a obtenção de maiores valores de absorvância, e conseqüentemente, maior sensibilidade do método, foi feito outro planejamento experimental empregando maiores faixa de concentração. Os valores estabelecidos para os níveis encontram-se na Tabela 22.

**Tabela 22.** Níveis estabelecidos no planejamento experimental sob novas condições de análise.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+ 1	+ 1,41
<i>Cp</i> -DAC (% m/v)	0,0232	0,0262	0,0343	0,0423	0,0464
CHAc (mol L <sup>-1</sup> )	5,00	5,87	8,00	10,1	11,0

A matriz de experimento, empregada neste estudo, para os novos níveis estabelecidos está descrita na Tabela 23.

**Tabela 23.** Matriz experimental sob novas condições de análise com valores de absorvância (495 nm) e os respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3).

Ensaio	CHAc (mol L <sup>-1</sup> )	<i>Cp</i> -DAC (% m/v)	Abs (495nm)	DPR (%)
1	5,87	0,0262	0,477	1,5
2	10,1	0,0262	0,693	4,7
3	5,87	0,0423	0,899	3,7
4	10,1	0,0423	1,33	0,42
5	8,00	0,0343	0,957	4,5
6	8,00	0,0343	0,863	9,9
7	8,00	0,0343	0,825	3,5
8	8,00	0,0343	0,771	4,6
9	5,00	0,0343	0,402	11
10	11,0	0,0343	0,619	0,076
11	8,00	0,0232	0,525	1,7
12	8,00	0,0464	0,814	1,0

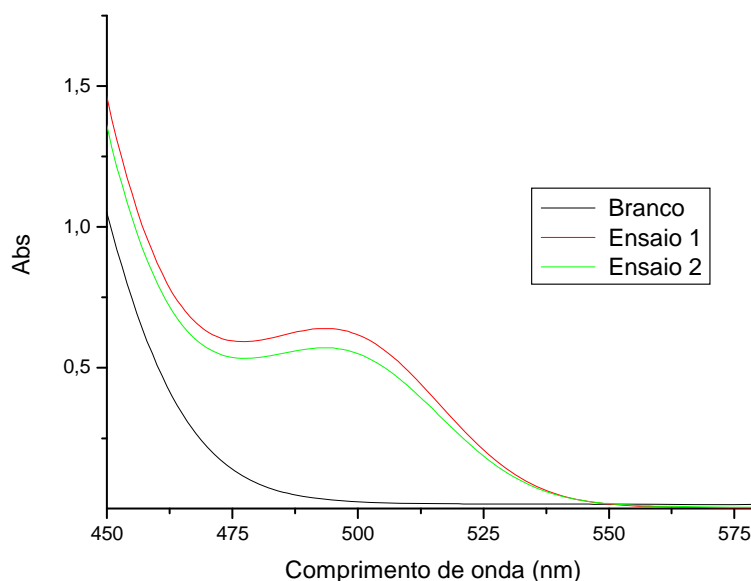
### 7.1.1.6 – Estudo da estabilidade do produto reacional

A avaliação da estabilidade do produto reacional, para a aplicação da espectrofotometria, foi feita conforme descrito no item 6.1.5.4. Neste estudo, os valores de absorvância, da solução de trabalho e da solução do branco, foram monitorados por 90 minutos e as medidas realizadas em intervalos de 10 minutos.

### 7.1.2 – Resultados e Discussão dos Dados

Neste estudo, a reação empregada foi entre glifosato e *p*-DAC, em meio acidificado (HAc), com máximo de absorção em 495 nm, conforme mecanismo proposto no item 6.4.

A Figura 36 apresenta o espectro de absorção da solução do branco, glifosato com *p*-DAC, em meio acidificado (Ensaio 1), e o mesmo teste empregando surfactante (Ensaio 2). No Ensaio 2 foi adicionado alíquota de 0,500 mL do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) na concentração de  $0,102 \text{ mol L}^{-1}$ , para avaliar o efeito do sinal do produto reacional em meio micelar .



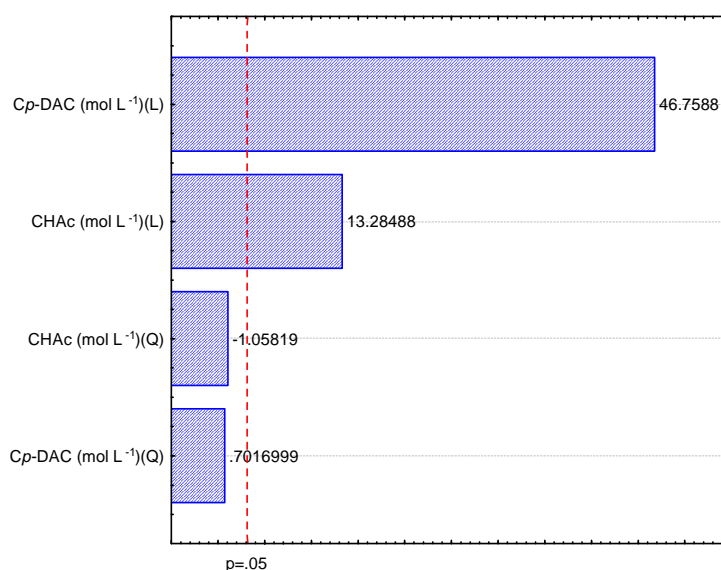
**Figura 36.** Espectro de absorção entre glifosato ( $101 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *p*-DAC (0,035%) em HAc ( $6,000 \text{ mol L}^{-1}$ ), com e sem a presença de SDS ( $5,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) no meio reacional.

O surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado neste ensaio por favorecer um meio reacional mais organizado devido à formação de micelas. Este meio é favorecido, principalmente, quando este surfactante está acima da concentração micelar crítica ( $> 8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Desta forma, há um aumento considerável na cinética da reação e maior sensibilidade é obtida pelo método analítico empregado.

De acordo com a Figura 36, os espectros obtidos mostram que a presença de SDS no meio reacional não favoreceu a cinética (Ensaio 2), uma vez que o maior valor de absorbância obtido foi sem a presença deste (Ensaio 1). Isto pode estar relacionado à concentração de SDS empregada, pois a concentração de SDS na solução de trabalho (10 mL) foi de  $5,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (item 7.1.1.4) estando, portanto, menor do que a concentração micelar crítica. Desta forma, o procedimento experimental adotado foi utilizando a reação entre glifosato e *p*-DAC, em meio de HAc, na ausência de surfactante.

#### 7.1.2.1 – Otimização das condições experimentais

As variáveis concentração de *p*-DAC e concentração de HAc, utilizando solução padrão de glifosato  $101 \text{ mg L}^{-1}$ , foram otimizadas empregando planejamento composto central. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 21 e nas Figuras 37 a 39.

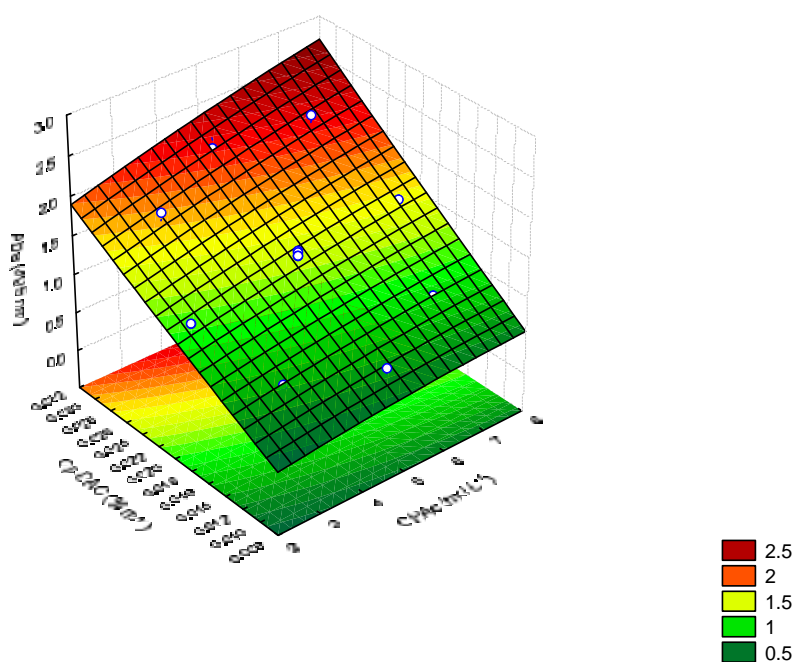


**Figura 37.** Gráfico de Pareto do planejamento composto central, empregando concentração de glifosato de  $101 \text{ mg L}^{-1}$ .

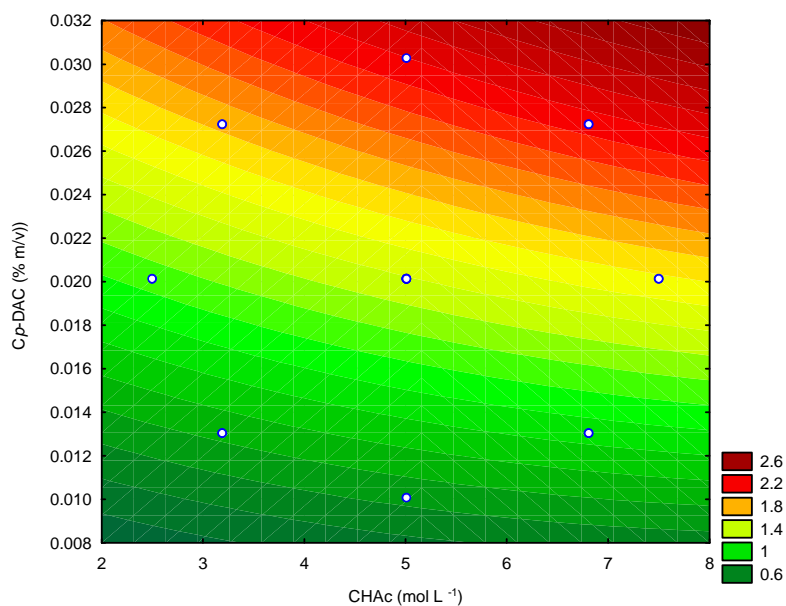
O gráfico de Pareto (Figura 37) representa a visualização dos principais efeitos das variáveis consideradas. Este gráfico mostra que o sinal positivo indica que o melhor sinal é obtido quando há um aumento do valor da respectiva variável, enquanto o sinal negativo indica que o melhor sinal é favorecido quando há diminuição desta variável, na faixa pré-estabelecida<sup>106</sup>.

Neste sentido, ambas variáveis, concentração de *p*-DAC e concentração de ácido acético, em sua forma linear, apresentam influência significativa no sinal analítico. Desta forma, maior sensibilidade do método analítico pode ser obtida empregando maiores faixas de concentração.

A mesma informação pode ser obtida analisando o gráfico de superfície de resposta (Figura 38) e sua respectiva curva de nível (Figura 39), uma vez que a região ótima de trabalho encontra-se na região de cor vermelha, ou seja, empregando concentrações maiores tanto para a variável *p*-DAC quanto a variável HAC.

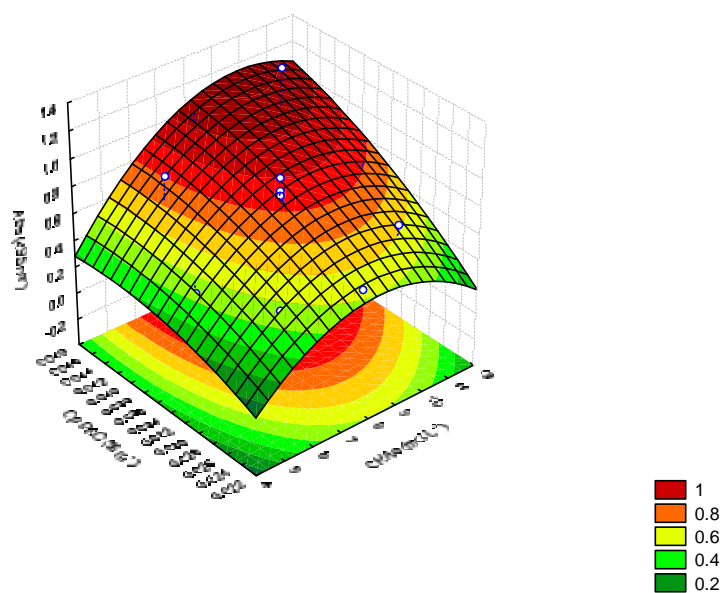


**Figura 38.** Gráfico de superfície de resposta obtido com os dados da matriz experimental, empregando concentração de glifosato de 101 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 39.** Curva de nível da superfície de resposta referente à Figura 38.

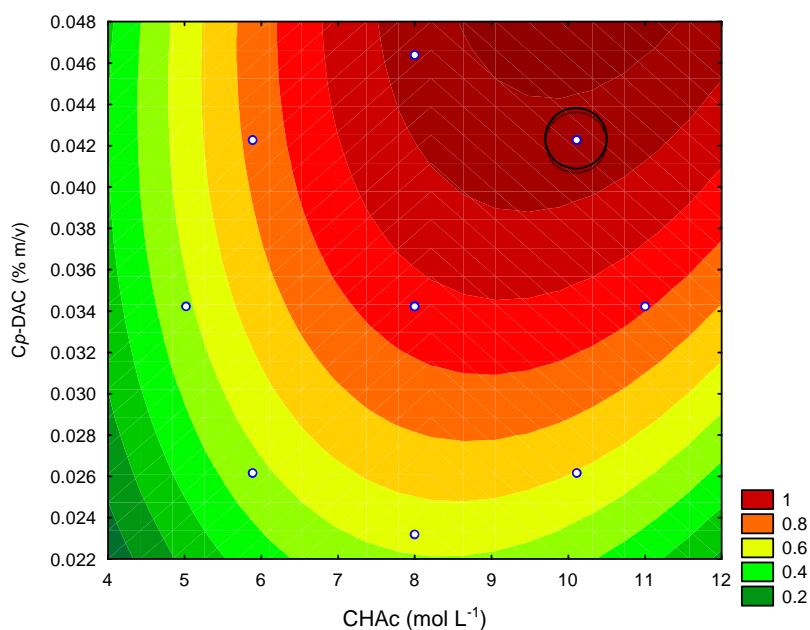
Desta forma, outro planejamento composto central, empregando uma faixa de concentração maior (Tabela 20) em relação ao planejamento experimental anterior (Tabela 22), foi realizado para as variáveis estudadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 23 e nas Figuras 40 e 41.



**Figura 40.** Gráfico de superfície de resposta obtido com os dados da segunda matriz experimental, empregando concentração de glifosato de 101 mg L<sup>-1</sup>.

O gráfico da superfície de resposta obtido no segundo planejamento, conforme apresentado na Figura 40, mostra que a região de cor vermelha (intensa) da superfície apresenta um sinal analítico de melhor resposta, devido ao maior valor de absorvância, de acordo com as condições em que as variáveis foram estudadas.

Este resultado também pode ser claramente visualizado na Figura 41, a qual apresenta a curva de nível referente ao gráfico da superfície de resposta obtido na Figura 40.



**Figura 41.** Curva de nível da superfície de resposta referente à Figura 40.

Após a obtenção da superfície de resposta foi verificado que as melhores condições experimentais utilizadas seria empregando concentração de *p*-DAC 0,042 % em HAc de concentração de 10,0 mol L<sup>-1</sup>, porque forneceria maior valor de absorvância e consequentemente, maior sensibilidade analítica ao método proposto.

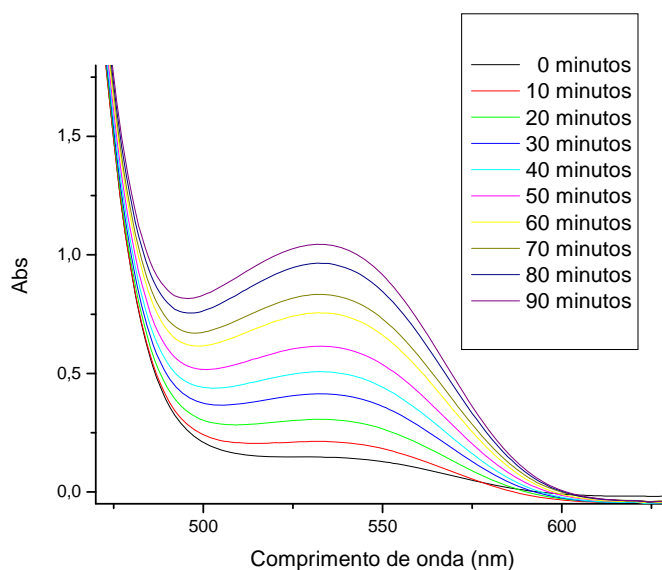
O valor de absorvância previsto, obtido empregando a equação matemática Equação 8, foi de 1,23. Este valor foi calculado pelo programa computacional (*Statistica*, versão 6.0) a partir dos gráficos apresentados nas Figuras 40 e 41, conforme descrito anteriormente (item 6.2.1).



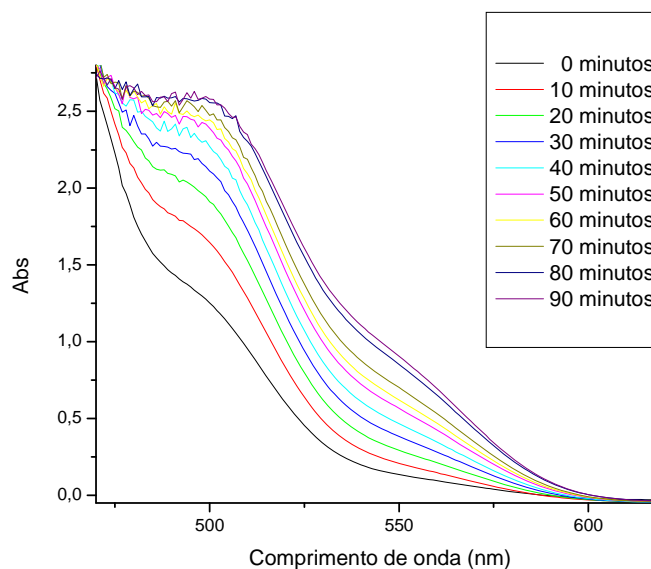
$$Z = -1,754 + 0,330 x - 0,0237 x^2 + 40,144 y - 619,125 y^2 - 3,079 xy \quad (8)$$

### 7.1.2.2 – Estudo da estabilidade do produto reacional

Após as condições experimentais estabelecidas, no preparo da solução de reagente cromogênico, foi feito o estudo da estabilidade da solução de branco bem como do produto reacional. Estas soluções foram monitoradas por um período de tempo de até 90 minutos e os espectros de absorção estão apresentados nas Figuras 42 e 43.



**Figura 42.** Estudo da estabilidade da solução do branco por 90 minutos, empregando concentração de *p*-DAC 0,042 % e concentração de HAc 10,0 mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 43.** Estudo da estabilidade do produto reacional por 90 minutos, empregando concentração de *p*-DAC 0,042 %, concentração de HAc 10,0 mol L<sup>-1</sup> e concentração de glifosato 101 mg L<sup>-1</sup>.

Estudos, preliminares, de solubilidade de *p*-DAC em ácido acético mostraram que este, por ser um ácido orgânico fraco, é necessário utilizar concentrações relativamente maiores, no preparo da solução de reagente cromogênico, em relação a outros ácidos como, o ácido clorídrico, por exemplo.

Embora melhor condição trabalho fosse empregando concentração de *p*-DAC 0,042 % e concentração de HAc de 10,0 mol L<sup>-1</sup> (Figura 41), experimentalmente não era viável devido à elevada concentração, principalmente de HAc.

Comparando os ensaios iniciais (Figura 36) com os ensaios realizados, nas condições ótimas de trabalho e considerando apenas o tempo de leitura em 20 minutos da solução de trabalho, após seu preparo (Figura 43), foi observado que o comportamento de ambos os espectros são completamente distintos, pois o comprimento de máxima absorção da reação não é observado quando as concentrações de *p*-DAC e HAc estão em excesso no meio reacional (Figura 43). No entanto, o comprimento de máxima absorção é claramente visualizado quando as concentrações de *p*-DAC e HAc (Figura 36) encontram-se em concentrações menores que as concentrações estabelecidas pelo planejamento experimental.

---

Outro fator importante é a estabilidade da reação por um tempo máximo de 60 minutos, para a obtenção de resultados precisos. Considerando esta condição de trabalho e analisando os espectros da solução de branco e da solução de amostra padrão de glifosato, verifica-se que logo após o preparo destas, de 0 minutos à 20 minutos, não foi possível a obtenção do produto reacional devido à instabilidade deste em momentos iniciais em que a reação ocorre.

Devido às dificuldades encontradas como na obtenção dos resultados, causado pela instabilidade da reação e na realização dos experimentos, não foi possível dar continuidade a este estudo. Além disso, a concentração de HAc ( $10 \text{ mol L}^{-1}$ ) obtida pelo planejamento experimental (Figura 41), por ser elevada, contrariava os Princípios da Química Verde, pois era necessário elevada concentração e causava forte cheiro, mesmo trabalhando em capela com os devidos cuidados operacionais.

## 7.2 – EMPREGANDO A REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO E NINIDRINA

### 7.2.1 – Parte Experimental

#### 7.2.1.1 – Materiais e equipamentos

- ✓ Nas medidas volumétricas foram empregadas vidrarias (buretas e pipetas) classe A, micropipetas “Eppendorf” (1000  $\mu$ L) e “Eppendorf” (10-100  $\mu$ L).
- ✓ As pesagens foram realizadas em balança analítica, modelo AG204, marca Mettler Toledo.
- ✓ Para aquecimento das soluções, utilizou-se um forno de microondas “Panasonic”.
- ✓ Nas medidas analíticas, utilizou-se um espectrofotômetro 8453 da marca Hewlett Packard, de feixe único com lâmpadas de tungstênio e deutério e com detector de arranjo de diodos, no qual foi acoplado o acessório de reflectância Labspere RSA.

#### 7.2.1.2 – Reagentes

- ✓ Glifosato (Sigma-Aldrich, 96 %)
- ✓ Ninidrina (Sigma-Aldrich, 95 %)
- ✓ Molibdato de sódio (Mallinckrodt AR<sup>®</sup>, 99,8 %)

#### 7.2.1.3 – Preparo das soluções

##### 7.2.1.3.1 – Solução estoque de molibdato de sódio (5,000 % m/v)

Esta solução foi preparada a partir da pesagem de 2,5000 g de molibdato de sódio, e este em seguida, dissolvida e transferida, quantitativamente, em água deionizada para um balão volumétrico de 50,00 mL e completado o volume.

#### 7.2.1.3.2 – Solução estoque de ninidrina (5,001 % m/v)

Para o preparo desta solução foi feita a pesagem de 2,5005 g de ninidrina e esta dissolvida em etanol. Em seguida, a solução foi transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico de 50,00 mL e completado o volume com etanol. Esta solução foi usada imediatamente após seu uso.

#### 7.2.1.3.3 – Solução padrão estoque de glifosato (404 mg L<sup>-1</sup>)

Esta solução foi preparada a partir da pesagem de cerca de 10,1 mg de glifosato padrão, dissolvida, em béquer, e a solução transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico de 25,00 mL e completado o volume com água deionizada.

A solução padrão de trabalho empregada em ensaios preliminares e planejamento experimental foi utilizando a concentração final de 12,6 mg L<sup>-1</sup> de glifosato. No preparo desta solução, alíquota de 0,312 mL da solução estoque foi diluída para 10,00 mL.

Para a obtenção da curva analítica, foram utilizadas alíquotas adequadas da solução padrão estoque (404 mg L<sup>-1</sup>), para as concentrações finais de 0,50 mg L<sup>-1</sup>; 1,00 mg L<sup>-1</sup>; 2,00 mg L<sup>-1</sup>; 4,00 mg L<sup>-1</sup>; 6,00 mg L<sup>-1</sup>; 8,00 mg L<sup>-1</sup> e 10,00 mg L<sup>-1</sup>.

#### 7.2.1.4 – Metodologia empregada

Para a obtenção do produto reacional, um volume da solução padrão de glifosato necessário para obter a concentração desejada, 1,00 mL da solução de ninidrina 5,001 % e 1,00 mL da solução de molibdato de sódio (5,000 %) foram transferidos para um béquer de 20,00 mL. Em seguida, estes foram aquecidos em potência média alta por 20 segundos em forno de microondas. Após o resfriamento da solução (temperatura ambiente), esta foi transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico de 10,00 mL.

Durante a etapa de aquecimento da solução no forno de microondas, foi necessária a utilização de 3 pedras de ebulição e vidro de relógio, em cada béquer, para evitar superaquecimento das soluções e, conseqüentemente, perdas.

### 7.2.1.5 – Otimização das condições experimentais

Ensaio preliminares, empregando concentração padrão de glifosato de 25,2 mg L<sup>-1</sup>, concentração de ninidrina (5,001 %) e molibdato de sódio (5,000 %), por espectrofotometria, foi realizado para verificar o valor de absorvância bem como comprimento de onda de máxima absorção.

Os resultados obtidos mostraram que o produto reacional apresenta um  $\lambda_{\text{máx}}$  em 570 nm, com absorvância, empregando essas condições de trabalho, de 0,999. Devido ao valor de absorvância ser aproximadamente 1, a otimização das condições experimentais foram feitas empregando concentração de solução padrão de glifosato de 12,6 mg L<sup>-1</sup>.

Para melhorar a sensibilidade do método proposto, foi realizado o planejamento fatorial completo (2<sup>3</sup>), por ser 3 variáveis envolvidas na reação. Estas foram estudadas em dois níveis, 0,400 % e 0,800 % para a variável concentração de ninidrina, 0,400 % e 0,800 % para a variável concentração de molibdato de sódio e 10 s e 20 s para a variável tempo de aquecimento das soluções em forno de microondas.

A Tabela 24 apresenta a matriz experimental empregada neste estudo. Para a realização deste planejamento foi realizado 8 experimentos, em duplicata, empregando potência média-alta em forno de microondas.

**Tabela 24.** Matriz experimental empregando planejamento fatorial completa (2<sup>3</sup>) e média dos valores de absorvâncias obtida para cada ensaio (n = 2).

Ensaio	CNinidrina (% m/v)	CMolibdato de sódio (% m/v)	Tempo (s)	Abs (570 nm)
1	0,400	0,400	10	0,01150
2	0,800	0,400	10	0,1750
3	0,400	0,800	10	0,02129
4	0,800	0,800	10	0,2707
5	0,400	0,400	20	0,2864
6	0,800	0,400	20	0,2555
7	0,400	0,800	20	0,4510
8	0,800	0,800	20	0,5200

### 7.2.1.6 – Aquecimento das soluções no forno de microondas

Após a realização dos ensaios do planejamento experimental, para a obtenção dos dados descrito na Tabela 24, devido ao aquecimento individual das soluções de trabalho, observou-se que, em cada ensaio, o aquecimento das soluções no forno de microondas ficava com a temperatura interna, no centro maior em relação às laterais do forno de microondas, fornecendo às soluções maior aquecimento, no mesmo intervalo de tempo, principalmente nos últimos ensaios e, portanto, baixa precisão entre as medidas.

Desta forma, testes foram realizados empregando concentrações de 0,800 % de ninidrina e 0,800 % de molibdato de sódio e 12,6 mg L<sup>-1</sup> para glifosato, concentrações das soluções de trabalho referente ao ensaio 8 (Tabela 24). Para a realização deste teste, o forno de microondas foi transferido para local mais refrigerado e a porta do forno foi mantida aberta, entre um experimento e outro, durante cerca de 5 minutos.

Neste ensaio, ao aquecer a solução de trabalho (3,50 mL), em béquer de 20,00 mL, utilizando potência média alta e tempo de aquecimento de 20 s, a reação não se precedeu conforme esperado, devido ao baixo valor de absorvância obtido em relação ao ensaio inicial.

Devido a isto, outras duas soluções foram aquecidas em potência média alta (p.m.a.) por um período de 25 s e 30 s, com valores de absorvâncias de 0,5567 e 0,5821, respectivamente, sendo estes resultados concordantes com os dados obtidos em testes iniciais.

### 7.2.1.7 – Aferição da potência do forno de microondas

Devido à dificuldade na obtenção da repetibilidade dos ensaios, proveniente da etapa de aquecimento das soluções de trabalho, o forno de microondas foi aferido. O procedimento de aferição foi realizado de acordo com a literatura<sup>107</sup>, conforme descrito a seguir:

Em um béquer contendo 1,00 L de água, pesada em uma balança semi-analítica, foi aquecida em diferentes tempos (90, 120 e 180 segundos) à potência média alta.

A Equação de conversão em potência empregada está descrita na Equação 9.

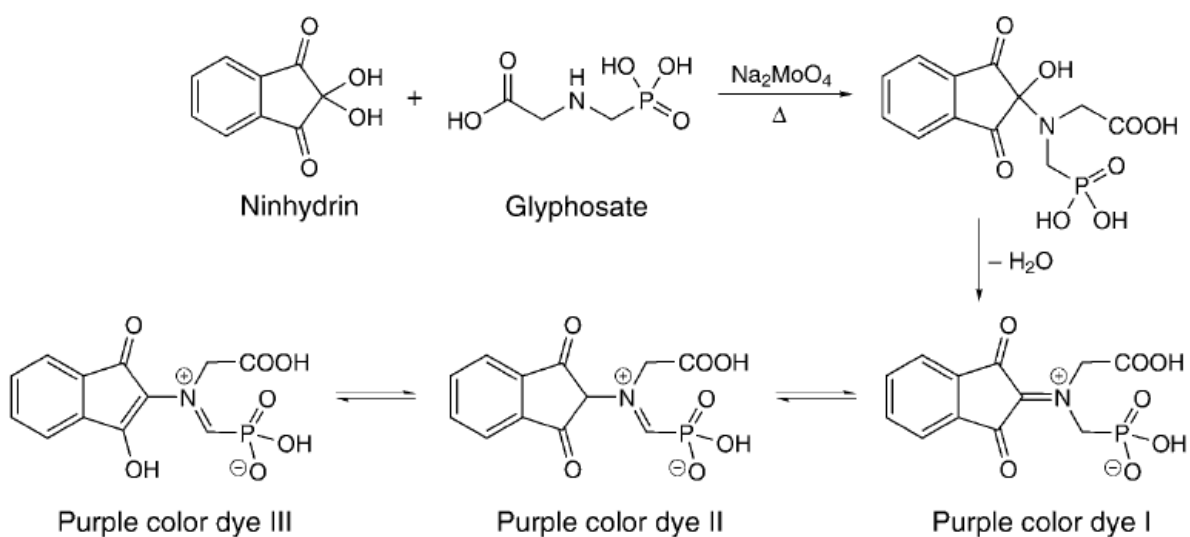
$$P = 4,18 \times m \times c \times \frac{\Delta T}{t} \quad (9)$$

Onde **P** refere-se à potência (W), **m** a massa de água (g), **c** o calor específico da água ( $1 \text{ cal.g}^{-1}.\text{°C}^{-1}$ ),  $\Delta T$  a variação da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), **t** ao tempo de aquecimento (s) e 4,18 ao fator conversão de calorias em joules.

### 7.2.2 – Resultados e Discussão

O método proposto é baseado na reação entre glifosato e ninidrina, como reagente cromogênico, na presença do molibdato de sódio, para aumento da cinética da reação.

A Figura 44 apresenta o provável mecanismo da reação, o qual forma um produto reacional de cor violeta/roxo, que apresenta um máximo de absorção em 570 nm.



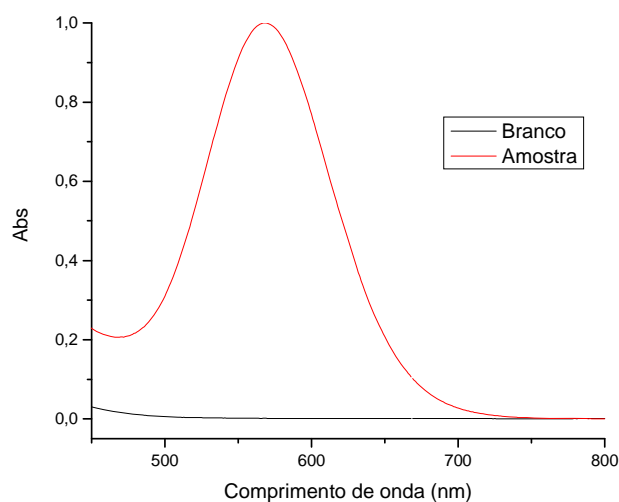
**Figura 44.** Provável mecanismo da reação entre glifosato e ninidrina, na presença de molibdato de sódio.

**Fonte:** Bhaskara e Nagaraja<sup>38</sup>

Segundo Bhaskara e Nagaraja<sup>38</sup>, esta reação ocorre somente com aquecimento. Desta forma, neste trabalho empregou-se forno de microondas, por apresentar aquecimento uniforme e rápido das soluções de trabalho em relação ao método já descrito na literatura<sup>38</sup>.



A Figura 45 apresenta o espectro de absorção do produto reacional (Figura 44), obtido após aquecimento em forno de microondas.



**Figura 45.** Espectro de absorção da reação entre glifosato ( $25,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ninidrina ( $5,001\% \text{ m/v}$ ), na presença de molibdato de sódio ( $5,000\% \text{ m/v}$ ).

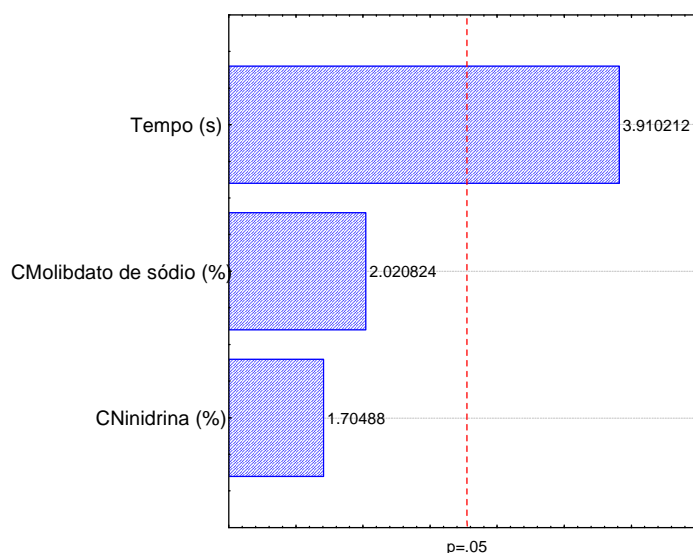
### 7.2.2.1 – Otimização das condições experimentais

Neste estudo, o preparo das soluções de trabalho foi feito conforme descrito no item 7.2.1.4, empregando tempo de aquecimento em forno de microondas de 10 s e 20 s, em diferentes potências. Os resultados obtidos com 10 s mostraram que não houve reação empregando as potências médias (média e média-baixa) e baixa. Entretanto os resultados obtidos com tempo de 20 s mostraram que:

- ✓ Alta: ocorre reação (observou-se coloração tendendo para a cor violeta)
- ✓ Média-alta: ocorre reação
- ✓ Média: reação incompleta (solução de coloração marrom)
- ✓ Média-baixa: não reage
- ✓ Baixa: não reage

Outro estudo realizado foi empregando tempo de aquecimento de 30 s e 40 s. Os resultados obtidos mostraram que empregando tanto 30 s quanto 40 s houve reação, mas com superaquecimento e perdas. Desta forma, a potência de aquecimento da solução foi fixada em potência média alta.

Após a avaliação do tempo e potência adequada ao aquecimento das soluções de trabalho, para a aplicação da espectrofotometria, foi realizado o planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) para a otimização das condições experimentais. As variáveis estudadas foram: concentração de ninidrina (%), concentração de molibdato de sódio (%) e tempo de aquecimento (s). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 24 e nas Figuras 46 a 48.

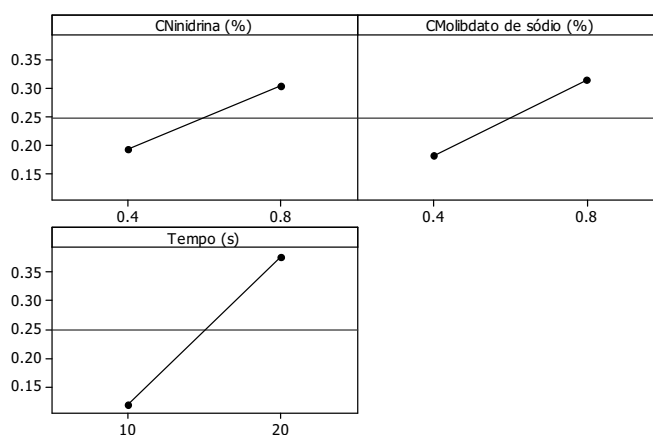


**Figura 46.** Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ).

O gráfico de Pareto mostra que as variáveis estudadas não apresentam influência no sinal analítico. Desta forma, as variáveis concentração de ninidrina e concentração de molibdato de sódio foram fixadas em 0,800 %, porque embora essa a faixa de concentração estudada não apresenta influência significativa no sinal analítico, melhor combinação para a obtenção de maior sensibilidade é empregando esta condição.

Dentre as variáveis estudadas, a variável tempo de aquecimento das soluções foi a variável que apresentou influencia significativa. Esta, também, foi fixada em 20 s, pois empregando aquecimento das soluções em potência média-alta, tempo maior que 20 s há perdas do produto reacional obtido.

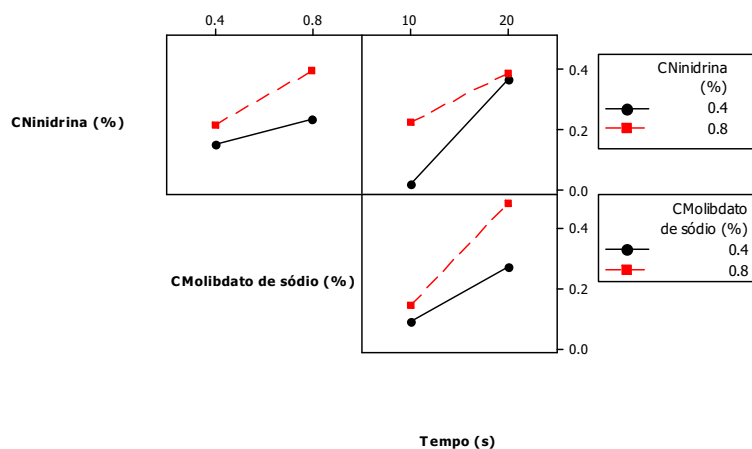
Outras informações podem ser obtidas por meio do gráfico dos efeitos principais (Figura 47) bem como do gráfico de interações entre as variáveis estudadas (Figura 48).



**Figura 47.** Gráficos dos efeitos principais das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo ( $2^3$ ).

A Figura 47 mostra que, para os dois níveis estabelecidos, os efeitos mais significativos são provenientes de maior inclinação da reta, observado para todas as variáveis em seu maior nível, corroborando com as informações obtidas pelo gráfico de Pareto (Figura 46).

Informações complementares podem ser visualizadas na Figura 48, a qual apresenta os principais efeitos das interações entre as variáveis ensaiadas.



**Figura 48.** Gráficos dos efeitos principais das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo ( $2^3$ ).

A Figura 48 mostra que, embora a variável tempo de aquecimento das soluções influenciam na interação de ambas as variáveis, concentrações de ninidrina e de molibdato de sódio, devido à ausência de paralelismo na variação das condições de análise, esta é mais pronunciada na concentração de molibdato de sódio.

A Tabela 25 apresenta as condições experimentais otimizadas, por meio de planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) para a determinação de glifosato, empregando ninidrina como reagente cromogênico.

**Tabela 25.** Condições experimentais otimizadas para a aplicação da espectrofotometria UV-Vis.

Variáveis	Condições experimentais
Concentração de ninidrina (%)	0,800
Concentração de molibdato de sódio (%)	0,800
Potência de aquecimento (W)	Média-alta
Tempo de aquecimento (s)	20

### 7.2.2.2 – Aferição da potência do forno de microondas

Devido à baixa repetibilidade e precisão do método proposto, em função do aquecimento das soluções, o forno de microondas foi aferido. Os valores de potência obtidos com a aferição do forno de microondas, nas temperaturas de 90, 120 e 180 segundos, encontram-se descrito na Tabela 26.

**Tabela 26.** Resultados obtidos na aferição do forno de microondas, empregando potência média alta.

Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Tempo (s)	Potência (W)
28	35	90	325,1
28	38	120	330,9
28	43	180	336,7

\* Média de duas medidas analíticas (n = 2).

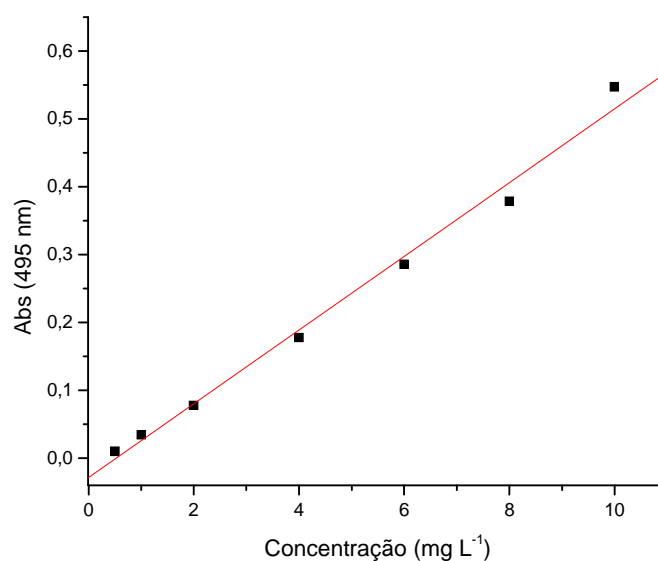
Conforme apresentado na Tabela 26, os resultados obtidos mostram que empregando diferentes tempos de aquecimento, a potência testada é a mesma durante seu tempo de uso, já que esta apresentou uma média de potência de 330,9 e desvio padrão relativo de 1,75 %. Sendo, portanto, um indicativo de que o forno de microondas está calibrado e apto ao uso por não haver variação de potência durante as suas utilizações.

### 7.2.2.3 – Curva analítica

Neste estudo, a curva analítica obtida, para a determinação de glifosato, foi na faixa de 0,50 mg L<sup>-1</sup> a 10,00 mg L<sup>-1</sup>. Os valores de absorvância obtidos, em duplicata, estão apresentados na Tabela 27 e representados na Figura 49.

**Tabela 27.** Valores de absorvância de cada replicata obtidos nas medidas analíticas.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Absorbância (570 nm)		
	Replicata 1	Replicata 2	Média
0,50	0,009758	0,01053	0,01014
1,00	0,03617	0,03295	0,03456
2,00	0,07022	0,08521	0,07772
4,00	0,2010	0,1545	0,1778
6,00	0,2885	0,2832	0,2859
8,00	0,4206	0,3369	0,3788
10,0	0,5277	0,5662	0,5470

**Figura 49.** Curva analítica obtida para a aplicação da espectrofotometria UV-Vis.

Neste estudo, a equação da reta obtida empregando a média das replicatas foi  $y = - 0,02845 + 0,05432 \times C$  e um coeficiente de correlação linear de 0,995.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados empregando 10 medidas da solução do branco e calculados conforme IUPAC (item 6.2.4), os quais foram de 0,13 mg L<sup>-1</sup> e 0,38 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Embora a faixa linear e os valores de limites de detecção e quantificação encontrados fossem bastante promissores para a aplicação deste método, na determinação de glifosato em amostras de herbicidas comerciais bem como em amostras ambientais, durante a realização dos ensaios foi possível observar a dificuldade de aquecimento das soluções.

O aquecimento das soluções de trabalho em forno de microondas foi proposto devido à facilidade de aquisição e utilização deste em laboratórios de análise química. Além disso, este proporciona aquecimento rápido e uniforme em relação aos outros sistemas como bico de bunsen, por exemplo.

No entanto, o aquecimento individual das soluções de trabalho tornou o método proposto moroso devido ao longo tempo de uso deste, mesmo em ambiente refrigerado. Outro fator importante são as variáveis envolvidas na etapa de aquecimento, quando se utiliza forno de microondas como altura e espessura do béquer, altura do volume da solução, temperatura interna diferenciada, devido à circulação de ar forçada, dentre outras. Essas variáveis devem ser cuidadosamente analisadas para a obtenção de resultados com boa precisão.

Desta forma, a metodologia desenvolvida apresentou desvantagem em relação ao método desenvolvido por Bhaskara e Nagaraja<sup>38</sup>, tornando-o, portanto, inviável a continuidade deste trabalho.

## 8 – SISTEMAS EM FLUXO

Os métodos de análise que envolve procedimento em fluxo contínuo constituem uma inovação em relação aos métodos analíticos atualmente existentes<sup>108</sup>. A análise química por injeção em fluxo (FIA) foi proposta em 1975 e, desde então, alcançou grandes proporções no ramo da pesquisa, abrangendo várias áreas da química analítica<sup>109</sup>. Essa aceitação foi devida a possibilidade deste processo desenvolver métodos analíticos de melhor precisão empregando equipamentos de baixo custo bem como a possibilidade do pesquisador desenvolver seu próprio módulo de análise.

Outras vantagens na aplicação do processo de análise química em fluxo é o pouco uso de vidrarias, a utilização de um sistema fechado, o que minimiza os riscos de contaminação e o baixo consumo de reagentes (da ordem de microlitros), o que o torna um procedimento ambientalmente amigável<sup>87</sup>.

A versatilidade dos processos em fluxo possibilita o acoplamento a vários tipos de detectores utilizados em análises químicas, tais como espectrofotometria, espectrofotometria de absorção e emissão atômica, potenciometria e condutimetria, dentre os quais o mais usual é a espectrofotometria UV-Vis em função do baixo custo, facilidade de operação, sensibilidade e velocidade de processamento<sup>106,110</sup>.

Desde a inserção de análise em fluxo (FIA), os sistemas em fluxos têm demonstrado ser uma poderosa ferramenta no manuseio de soluções. Em geral, a amostra é introduzida no sistema e submetida a condições reprodutíveis em sistemas fechados, evitando possíveis contaminações externas<sup>111</sup>.

Segundo Reis<sup>110</sup>, este processo baseia-se na inserção da amostra em um fluido carregador que transporta a mesma em direção ao detector. No decorrer da análise a amostra sofre dispersão, produzindo uma zona de amostra caracterizada pela existência de gradientes de concentração. Nessa zona de amostra ainda podem ocorrer reações químicas enquanto a mesma é carregada até o detector. Devido à existência de gradientes de concentração e pelo fato da detecção ser feita com a zona de amostra em movimento, obtém-se como resultado um sinal transiente cuja altura pode ser relacionada à concentração da espécie de interesse<sup>112</sup>.

Uma característica importante no sistema em fluxo à vazão constante é que o tempo de trânsito entre o injetor (sistema de coleta da amostra e sua inserção no percurso analítico) e o detector deve ser exatamente o mesmo para padrões e amostras, podendo,



em vista disso, as leituras serem feitas sem a reação se completar.

O sistema de análise por injeção em fluxo (FIA), em geral pode ser dividido em quatro partes<sup>110</sup>:

- ✓ Propulsão dos fluidos, realizada através de bomba peristáltica, a qual promove o movimento do fluido carregador e das demais soluções;
- ✓ Inserção da amostra, realizada através de injetor comutador ou válvulas solenoides (6 ou 8 vias), o qual permite a inserção da solução de amostra e reagente no sistema;
- ✓ Zona de reação, onde ocorrem as interações necessárias à detecção da espécie de interesse;
- ✓ Unidade de detecção, equipamento que possibilita as leituras e os sinais são obtidos.

Desde o surgimento, os sistemas de análise por injeção apresentam inovações, como a possibilidade de utilização de diferentes módulos de análises<sup>110</sup> e incorporação de extração com solvente, resina de troca iônica, geração de gás, método de adição de padrão, diluição, pré-concentração, dentre outros, ao sistema.

Embora a incorporação destes procedimentos em linha tenha facilitado o tratamento da amostra a ser analisada, a necessidade de se adaptar a novos requisitos de análise, especialmente, em termos de número, qualidade e diversidade de amostras, foram fatores fundamentais para uma acentuada evolução desses sistemas ao longo dos anos. Dentre os avanços deste procedimento de análise, podemos destacar o surgimento de novos sistemas em fluxo tais como sistema de exploração de fluxo descontínuo, sistema de injeção sequencial, multicomutação, multiseriga e multi-bombas.

Segundo Lima *et al.*<sup>113</sup>, os sistemas em fluxo miniaturizados surgiram da limitação do sistema propulsor empregado em análise por injeção em fluxo. De acordo com Matos *et al.*<sup>114</sup>, as bombas peristálticas, embora versáteis e com multicanais, apresentam elevado custo em sua aquisição, além de tubos específicos para determinados solventes orgânicos e troca periódica dos mesmos. Outra limitação da sua utilização está no ajuste da relação entre as vazões dos diferentes canais da mesma bomba, ditada pela disponibilidade de tubos com diâmetros internos diferentes.

A análise por injeção sequencial (SIA) é composta de bombas de sucção e válvulas de multiposição de alta precisão. A via central da válvula é conectada a uma via lateral que tem comunicação através de um canal interno com as alças de amostra e reagente, que são transportadas até o detector por um fluído carregador<sup>111</sup>. Numa mais recente modalidade de análise em fluxo, nomeadamente na multicomutação<sup>115</sup>, as soluções podem ser introduzidas através de válvulas solenóides proporcionando uma grande versatilidade e flexibilidade ao sistema. Os sistemas de multicomutação podem basear-se no uso de bombas peristálticas, no entanto, quando é necessário incorporar na montagem um processo de separação, o manuseamento de líquidos deve basear-se em bombas de pistão, tal como nas estratégias de multiseringa<sup>116</sup>.

O sistema de multi-bombas<sup>117</sup>, outra técnica de fluxo, tem avanços muito promissores na área de miniaturização de análises químicas. Este sistema baseia-se na criação de um fluxo pulsado onde as condições da mistura são bem melhores, em relação aos outros sistemas em fluxo, resultando numa sensibilidade analítica aumentada, permitindo também uma redução significativa no consumo de reagentes e na produção dos efluentes.

Portanto, este trabalho teve como objetivo aplicar sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) e sistema em fluxo com multi-bombas (MPFS), com detecção espectrofotométrica, para a determinação de glifosato em amostras de herbicidas comerciais e amostras de interesse ambiental. A reação proposta neste trabalho, também foi baseada na reação entre glifosato e *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) em meio ácido, o qual produz um composto que apresenta um máximo de absorção em 495 nm.

## 8.1 – EMPREGANDO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

### 8.1.1 – Parte Experimental

#### 8.1.1.1 – Materiais e equipamentos

- ✓ Micropipetas da marca Eppendorf e Brand (100-1000 µL e 10-100 µL), foram utilizadas para medir o volume das soluções.

- ✓ Balança analítica AG204 da marca Mettler Toledo, com rotação variável (1 a 50 rpm) foi utilizada na pesagem das amostras e reagentes.
- ✓ Banho de ultrassom da marca Thornton, foi utilizado para solubilização dos reagentes.
- ✓ Bomba peristáltica da marca Gilson, de 8 canais, foi utilizada para a propulsão das soluções (soluções de amostras e transportadora).
- ✓ No sistema de fluxo foram empregados tubos de Tygon com 4 mm de diâmetro interno, com vazão de aproximadamente  $0,70 \text{ mL min}^{-1}$  para a amostra e  $0,80 \text{ mL min}^{-1}$  para solução carregadora.
- ✓ Conectores e tubos de politetrafluoretileno (PTFE) com 0,8 mm de diâmetro interno e comprimentos variáveis (50 e 100 cm) foram empregados no sistema de análise por injeção em fluxo.
- ✓ Injetor comutador de acrílico com barra deslizante, constituído de duas peças fixas e uma peça móvel, foi utilizado para a inserção das soluções (amostra e transportadora) no sistema por linha única.
- ✓ Espectrofotômetro Ocean optics da marca UBS 4000, equipado com cela de fluxo de  $80 \mu\text{L}$  e caminho óptico de 1 cm foi utilizado na obtenção dos valores de absorbância na região UV-visível.
- ✓ Microcomputador, equipado com uma interface eletrônica (OOIBase 32, Ocean Optics) foi utilizado para controle e aquisição dos dados.

#### 8.1.1.2 – Reagentes

- ✓ Glifosato (Sigma-Aldrich, 96 %)
- ✓ *p*-Dimetilaminocinamaldeído (Aldrich, 98 %)
- ✓ Ácido clorídrico (Merck, 37 %)
- ✓ Ácido nítrico (Quimex, 65%)
- ✓ Ácido sulfúrico (Mallinckrodt AR<sup>®</sup>, 98%)
- ✓ Ninidrina (Sigma Aldrich, 95%)

- ✓ Molibdato de sódio (Mallinckrodt AR<sup>®</sup>, 99,8%)
- ✓ Nitrito de sódio (Riedel-de Haën, 99%)
- ✓ Brometo de potássio (Merck, 99%)

### 8.1.1.3 – Preparo das soluções

#### 8.1.1.3.1 – Solução de *p*-DAC (0,1503 % m/v) em HCl (0,0541 mol L<sup>-1</sup>)

Para o preparo desta solução, pesou-se 0,1503 g de *p*-DAC e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, em seguida adicionou-se 5,00 mL de HCl padronizado (1,082 mol L<sup>-1</sup>) e completou-se o volume com água deionizada. Em todos os ensaios realizados as medidas foram feitas em replicatas (n = 3) e esta solução preparada diariamente.

#### 8.1.1.3.2 – Soluções padrão de glifosato

O planejamento experimental, realizado para a obtenção das condições ótimas de trabalho, foi feito utilizando concentração de solução padrão de glifosato de 500 mg L<sup>-1</sup>. Esta solução foi preparada a partir da diluição da solução padrão de glifosato (2,04 x 10<sup>3</sup> mg L<sup>-1</sup>), preparada conforme descrito no item 6.3.1.

Para a obtenção da curva analítica, as soluções padrão de trabalho utilizadas na determinação de glifosato foram preparadas mediante diluições adequadas da solução estoque de 2,04 x 10<sup>3</sup> mg L<sup>-1</sup> para a obtenção das seguintes soluções de concentrações finais de: 40 mg L<sup>-1</sup>; 80 mg L<sup>-1</sup>; 160 mg L<sup>-1</sup>; 240 mg L<sup>-1</sup>; 320 mg L<sup>-1</sup>; 400 mg L<sup>-1</sup>; 480 mg L<sup>-1</sup>; 560 mg L<sup>-1</sup> e 640 mg L<sup>-1</sup>.

#### 8.1.1.3.3 – Solução de ninidrina (5,075 % m/v)

Devido à baixa solubilidade de ninidrina em água, preparou-se uma solução saturada de ninidrina 5,075 % (m/v), a partir da pesagem de 0,5075 g e transferência, quantitativa, para um balão volumétrico de 10,00 mL com água deionizada.

#### 8.1.1.3.4 – Solução de molibdato de sódio (5,006 % m/v)

Esta solução foi preparada a partir da pesagem de 0,5006 g e esta massa transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico de 10,00 mL com água deionizada.

#### 8.1.1.3.5 – Solução de nitrito de sódio (0,2001 mol L<sup>-1</sup>)

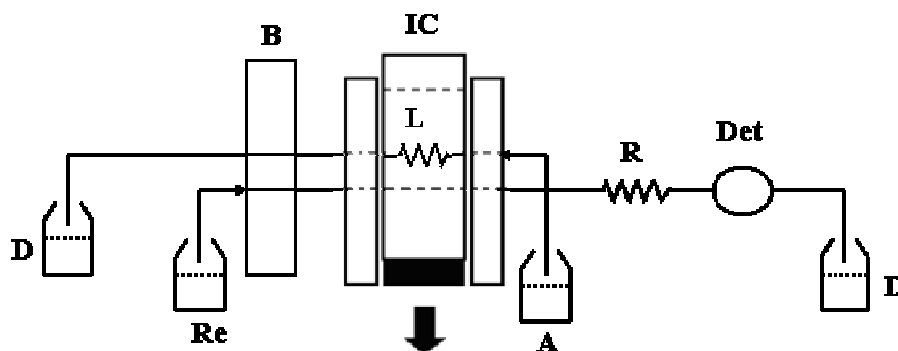
No preparo desta solução, pesou-se uma massa de 0,3452 g e transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico de 25,00 mL com água deionizada.

#### 8.1.1.3.6 – Solução de brometo de potássio (25,39 % m/v)

Esta solução foi preparada a partir da pesagem de 2,5386 g e esta massa transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico de 10,00 mL com água deionizada.

#### 8.1.1.4 – Metodologia empregada

O módulo de análise empregado neste estudo foi o sistema de linha única, similar ao descrito na literatura<sup>118</sup> (Figura 50). Neste sistema a zona de amostra é injetada em um fluxo carregador de reagente e conforme a zona injetada se move, a solução de amostra se dispersa no reagente, formando o produto da reação.



**Figura 50.** Diagrama de fluxo do sistema FIA usado na determinação de glifosato. IC: injetor comutador; L: alça de amostragem (50 cm); A: solução padrão de glifosato ou amostra ( $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ ); Re; solução de *p*-DAC 0,1503 % (m/v) ( $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ ); R: reator (100 cm x 0,8 mm d.i.); B: bomba peristáltica; D: descarte e Det: detector (495 nm). A seta indica a direção do fluxo.

Conforme apresentado na Figura 50, o injetor está na posição de amostragem, sendo a amostra bombeada através da alça de amostragem. Quando o injetor é comutado para a posição de inserção (sentido da seta), insere-se o volume da alça de amostragem no caminho do fluido carregador (solução de reagente) e este transporta a amostra em direção ao detector, sendo que durante o transporte a amostra se dispersa continuamente no fluido carregador, gerando um gradiente de concentração no percurso analítico<sup>110</sup>. Um fluxo através do detector, posicionado após a reação ter ocorrido, registra o sinal transiente por meio da absorvância ( $\lambda_{\text{máx}}$  495 nm), cuja magnitude é proporcional à concentração do glifosato. Após o registro do valor máximo de absorvância, o injetor comutador retorna à posição inicial (posição de amostragem) iniciando outro ciclo de medidas.

#### 8.1.1.5 – Planejamento experimental

A triagem das variáveis para a aplicação do sistema de análise por injeção em fluxo, proposto à determinação de glifosato, foi feito por meio de análise quimiométrica empregando o planejamento fatorial fracionário ( $2^{5-1}$ )<sup>96</sup>. As variáveis físicas e químicas estudadas nos níveis pré-estabelecidos estão apresentadas na Tabela 28 e os valores de absorvância (495 nm) e seus respectivos desvio padrão relativo estão apresentados na Tabela 29.

**Tabela 28.** Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental  $2^{5-1}$ .

Variável	Níveis	
	-1	+1
<i>Cp</i> -DAC (% m/v)	0,101	0,182
CHCl (mol L <sup>-1</sup> )	0,0500	0,0799
Alça de amostra (cm)	50	100
Bobina de reação (cm)	60	100
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	0,4	1,0

**Tabela 29.** Matriz das variáveis estudadas, valores de absorbância e os respectivos desvio padrão relativo (DPR, n = 3) de todos os experimentos.

Amostra	<i>Cp</i> -DAC (% m/v)	CHCl (mol L <sup>-1</sup> )	Alça de amostra (cm)	Bobina (cm)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Abs (495 nm)	DPR (%)
1	0,101	0,0500	50	60	1,0	0,3285	1,71
2	0,182	0,0500	50	60	0,4	0,9708	3,08
3	0,101	0,0799	50	60	0,4	0,6029	0,937
4	0,182	0,0799	50	60	1,0	0,5152	1,08
5	0,101	0,0500	100	60	0,4	0,6909	0,834
6	0,182	0,0500	100	60	1,0	0,4808	0,893
7	0,101	0,0799	100	60	1,0	0,2983	0,906
8	0,182	0,0799	100	60	0,4	1,050	0,562
9	0,101	0,0500	50	100	0,4	0,8918	1,33
10	0,182	0,0500	50	100	1,0	0,5541	1,09
11	0,101	0,0799	50	100	1,0	0,3306	1,79
12	0,182	0,0799	50	100	0,4	1,309	1,17
13	0,101	0,0500	100	100	1,0	0,4668	2,03
14	0,182	0,0500	100	100	0,4	1,162	0,673
15	0,101	0,0799	100	100	0,4	0,7138	0,992
16	0,182	0,0799	100	100	1,0	0,7463	2,33

Outro planejamento experimental foi realizado (planejamento fatorial completo)<sup>95</sup> sob novas condições de análise. A matriz utilizada neste estudo bem como os valores de absorvância e coeficientes de variação está apresentada na Tabela 30.

**Tabela 30.** Matriz utilizada no planejamento fatorial completo ( $2^3$ ), valores de absorvância e os respectivos desvio padrão relativo (DPR,  $n = 3$ ) de todos os experimentos.

Amostra	Cp-DAC (% m/v)	Bobina (cm)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Abs (495 nm)	DPR (%)
1	0,101	100	0,7	0,1960	1,53
2	0,150	100	0,7	0,3490	0,993
3	0,101	150	0,7	0,2443	0,473
4	0,150	150	0,7	0,4277	0,714
5	0,101	100	1,4	0,09633	1,59
6	0,150	100	1,4	0,1740	8,05
7	0,101	150	1,4	0,1255	0,563
8	0,150	150	1,4	0,1990	0,870

#### 8.1.1.6 – Estudo de íons interferentes nas formulações comerciais

Estudos de espécies interferentes dos ingredientes presentes nas formulações comerciais de herbicida foram avaliados em diferentes concentrações dos mesmos à solução padrão de glifosato contendo 200 mg L<sup>-1</sup>. Os compostos estudados foram N-nitrosoglifosato, glufosinato, polioxietileno amina, isopropilamina e 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), na faixa de concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> a 2 mg L<sup>-1</sup> e formaldeído, na faixa de 150 mg L<sup>-1</sup> a 320 mg L<sup>-1</sup>, conforme descrito no item 6.3.6.1.



### 8.1.1.7 – Aquisição e preparo das amostras para análise

Para a aplicação do método analítico baseado em sistema de fluxo, além das três amostras de herbicidas comerciais, utilizadas na espectroscopia de reflectância difusa, amostras A, B e C (item 6.1.5.5) foi utilizado também uma amostra de herbicida comercial da marca D, sendo esta diluída a 25 % (m/v) em nosso laboratório.

#### 8.1.1.7.1 – Análise das amostras por FIA

Para a determinação do teor de glifosato nessas amostras, as soluções de análise foram preparadas a partir da diluição da amostra original, conforme descrito no item 6.3.7.1.

#### 8.1.1.7.2 – Análise das amostras por espectrofotometria Uv-vis (570 nm)

As soluções de trabalho das amostras de herbicidas comerciais foram preparadas de acordo com Bhaskara e Nagaraja<sup>38</sup>, conforme descrito a seguir:

As soluções de herbicidas originais, foram inicialmente diluídas a partir de uma alíquota de 70,0  $\mu\text{L}$  e transferida para um balão de 100,00 mL. Em seguida, alíquota de 10,0  $\mu\text{L}$  desta solução foi transferida para um tubo de ensaio, e adicionado 340  $\mu\text{L}$  de água deionizada. A esta solução também foram adicionados 1,00 mL de solução de ninidrina (5,075 % m/v) e solução de molibdato de sódio (5,006 % m/v). Em seguida, o tubo de ensaio foi colocado em banho de aquecimento à temperatura de 100 °C, por aproximadamente 5 minutos. Após o resfriamento desta solução (temperatura ambiente), esta foi transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico de 10,00 mL, com o auxílio de um funil.

Todas as soluções de amostras foram feitas em triplicata e a curva analítica foi obtida empregando o mesmo procedimento experimental, utilizando soluções padrão de glifosato na faixa de concentração de 0,100  $\text{mg L}^{-1}$  a 3,50  $\text{mg L}^{-1}$ , diluições feitas a partir de uma solução padrão estoque de 500  $\text{mg L}^{-1}$ .

### 8.1.1.7.3 – Análise das amostras por espectrofotometria Uv (243 nm)

As soluções de trabalho das amostras de herbicidas comerciais foram preparadas de acordo com a literatura<sup>119</sup>, conforme descrito a seguir:

As soluções de herbicidas originais foram feitas a partir de uma pesagem de 0,5098 g e transferida, quantitativamente, com 5,00 mL de água deionizada para um balão volumétrico de 100,00 mL. Em seguida, adicionou-se 0,500 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1), 0,100 mL de solução de KBr (25,39 %) e 0,500 mL de solução de NaNO<sub>2</sub> (0,2001 N). Em seguida, deixou-se a solução em repouso por 40 minutos e completou-se o volume e fez-se a medida espectrofotométrica.

Todas as soluções de amostras foram feitas em triplicata e a curva analítica foi obtida empregando o mesmo procedimento experimental, utilizando soluções padrão de glifosato na faixa de concentração de 0,100 mg L<sup>-1</sup> a 3,50 mg L<sup>-1</sup>, diluições feitas a partir de uma solução padrão estoque de 500 mg L<sup>-1</sup>.

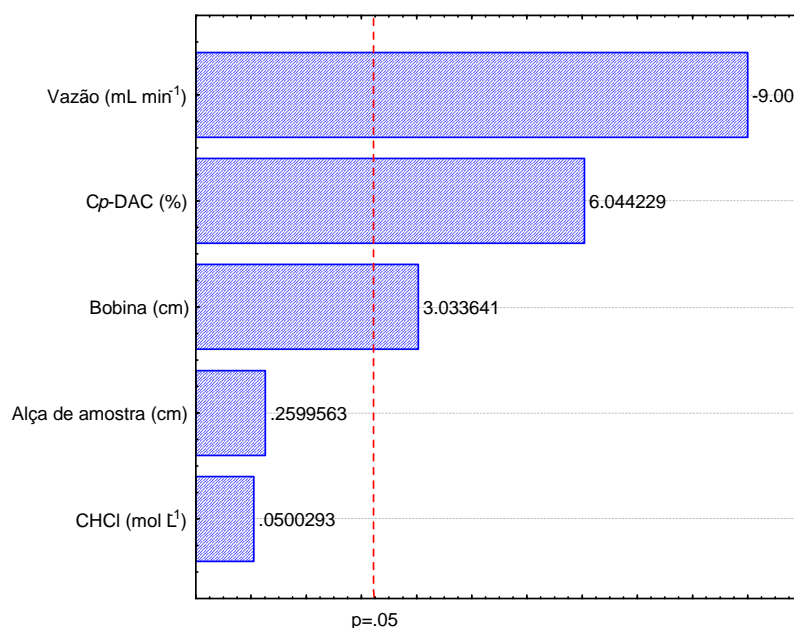
## 8.1.2 – Resultados e Discussão

Devido à inexistência de procedimentos em fluxo para o analito em estudo, optou-se por um sistema em linha única para evitar uma maior diluição das soluções, em decorrência da reação empregada ser lenta e, também, pela vantagem de ser mais simples de ser executado por um técnico na análise das formulações comerciais. Processos de fluxos intermitentes<sup>118</sup> são melhoramentos no sistema de injeção-comutação que acarretariam menor consumo de reagentes e amostra com menor geração de resíduo. Entretanto, quando dispositivos automáticos são disponíveis para injeção, um procedimento com parada de fluxo é uma opção melhor do que a adição por fluxos intermitentes<sup>120</sup>.

### 8.1.2.1 – Otimização das condições experimentais

Experimentos preliminares realizados em nosso laboratório com a utilização dos ácidos clorídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico e acético para o desenvolvimento da reação revelaram que o ácido clorídrico apresentou maiores valores de absorbância bem como estabilidade do produto reacional.

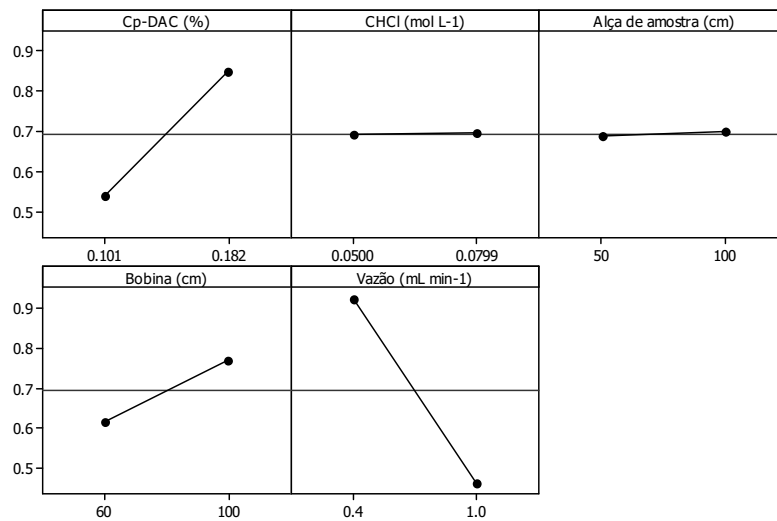
Após a triagem das variáveis envolvidas na reação, estas foram otimizadas a partir de condições experimentais definidas preliminarmente em dois níveis (+1 e -1). As variáveis estudadas foram: concentração de *p*-DAC, concentração de HCl, alça de amostragem, reator e vazão. Neste planejamento, dezesseis ensaios ( $n = 3$ ) foram realizados e a média dos valores de absorbância (495 nm) estão apresentados na Figura 51.



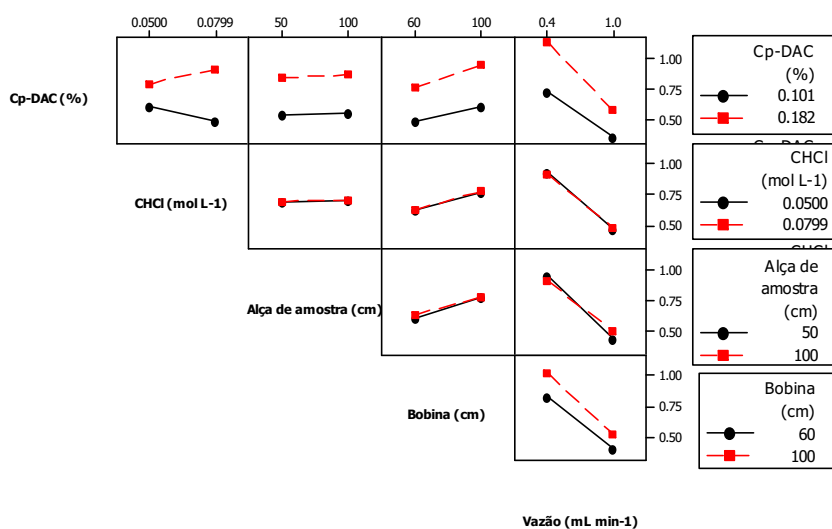
**Figura 51.** Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial fracionário ( $2^{5-1}$ ).

O gráfico de Pareto obtido com os ensaios do planejamento fatorial fracionário (Figura 51) mostra que concentração de HCl e alça de amostragem foram as variáveis que menos influenciam na reação entre *p*-DAC e glifosato, por apresentarem efeitos menores que 5 %.

Esta informação corrobora com os gráfico dos efeitos principais das variáveis bem como com o gráfico que apresenta efeitos de interações entre as variáveis, conforme apresentado nas Figuras 52 e 53, respectivamente, devido a baixa inclinação em ambas variáveis. Desta forma, a concentração de HCl e alça de amostragem foram fixadas nos níveis mais baixo (-1).



**Figura 52.** Gráficos dos efeitos principais das variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário ( $2^{5-1}$ ).



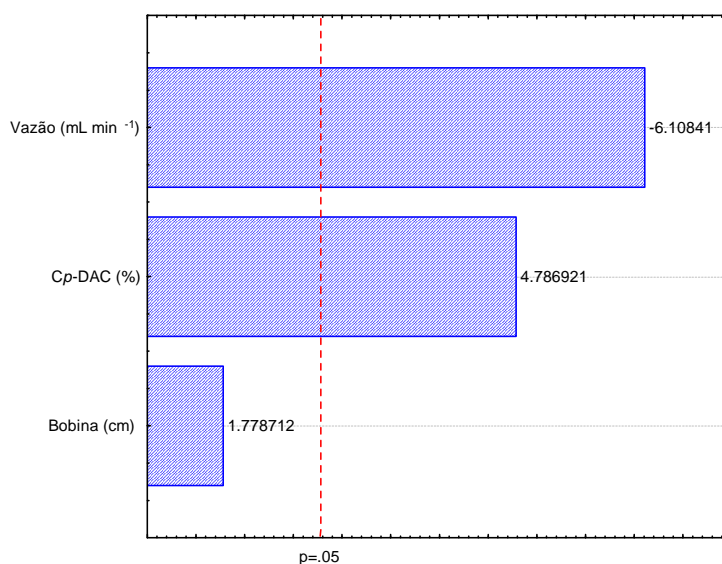
**Figura 53.** Gráficos dos efeitos de interações entre as variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário ( $2^{5-1}$ ).

A Tabela 31 apresenta as variáveis com os respectivos níveis estudados bem como as condições otimizadas nesta planejamento experimental.

**Tabela 31.** Variáveis estudadas com suas respectivas condições experimentais otimizadas pelo planejamento fatorial fracionário ( $2^{5-1}$ ).

Variáveis	Níveis		Condição adotada
	-1	+1	
Cp-DAC (% m/v)	0,101	0,182	-
CHCl (mol L <sup>-1</sup> )	0,0500	0,0799	0,0500
Alça de amostragem (cm)	50	100	50
Reator (cm)	60	100	-
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	0,4	1,0	-

Já a concentração de *p*-DAC, comprimento do reator e vazão foram as variáveis que mais influenciaram no sinal analítico (Figuras 51 e 52). Então, para a obtenção de uma melhor resposta foi realizado um planejamento fatorial completo<sup>96</sup> sob novas condições de análise. Os resultados obtidos com a média dos valores de absorbância estão apresentados graficamente na Figura 54.

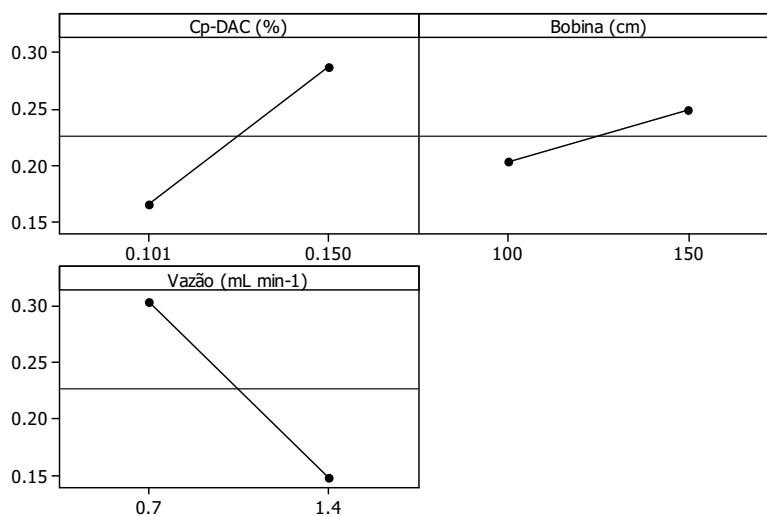


**Figura 54.** Gráfico de Pareto obtido no planejamento experimental  $2^3$ .

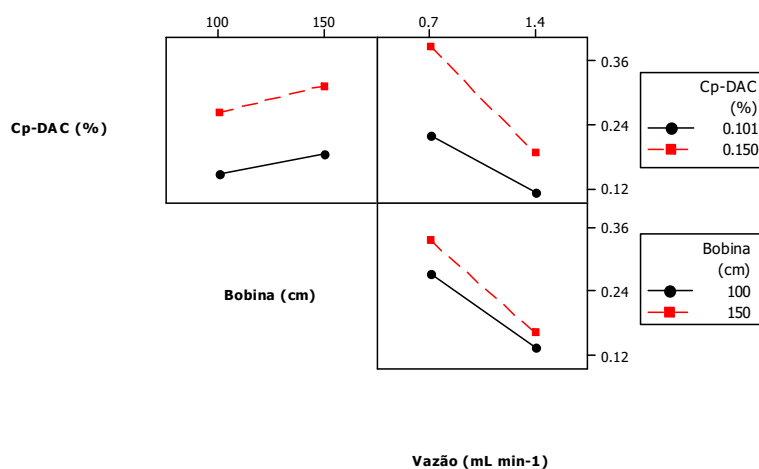
Neste ensaio, o gráfico de Pareto obtido (Figura 54) mostra que sob esta condição experimental, o comprimento do reator foi a variável que menos influencia na reação, sendo, portanto, fixada no nível mais baixo (-1). Para a concentração de *p*-DAC, maior sensibilidade analítica seria obtida aumentando a concentração desta solução e por questões de solubilidade, esta foi fixada no nível mais alto (+1), uma vez que esta é a concentração máxima de *p*-DAC em HCl 0,0541 mol L<sup>-1</sup>.

Já para a variável vazão, este gráfico mostra que diminuindo vazão do sistema aumentaria a resposta analítica. Como a vazão no nível -1 é de 0,7 mL min<sup>-1</sup>, não é viável para o método a aplicação de vazão menor devido à diminuição significativa da frequência analítica.

Essas informações também podem ser visualizadas pelos gráficos apresentados nas Figuras 55 e 56.



**Figura 55.** Gráficos dos efeitos principais das variáveis obtido no planejamento 2<sup>3</sup>.



**Figura 56.** Gráficos dos efeitos de interações entre as variáveis obtidas no planejamento  $2^3$ .

A Tabela 32 apresenta as variáveis empregadas neste planejamento com os respectivos níveis estudados bem como os resultados das condições otimizadas empregadas.

**Tabela 32.** Variáveis estudadas com suas respectivas condições experimentais otimizadas pelo planejamento fatorial completo ( $2^3$ ).

Variáveis	Níveis		Condição adotada
	-1	+1	
Cp-DAC (% m/v)	0,101	0,150	0,150
CHCl (mol L <sup>-1</sup> )	-	-	-
Alça de amostragem (cm)	-	-	-
Reator (cm)	100	150	100
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	0,7	1,4	0,7

### 8.1.2.2 – Curva analítica e validação do método proposto

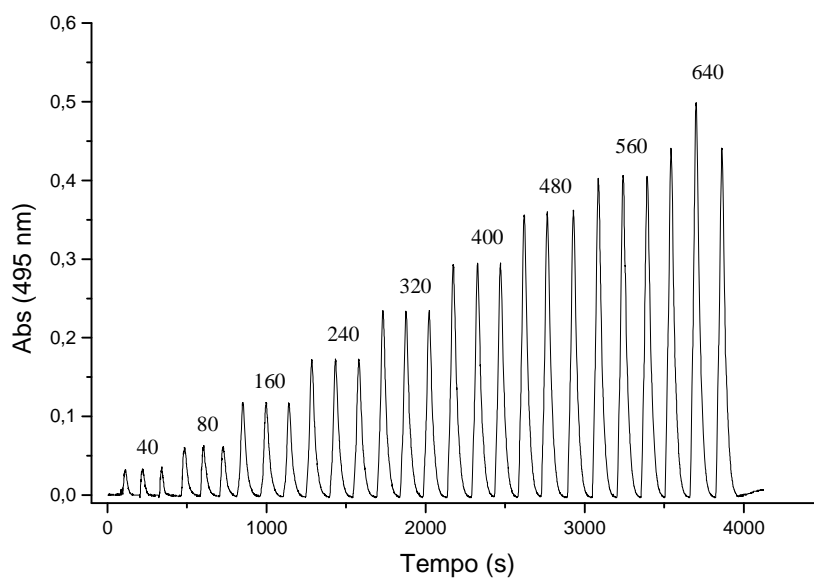
Para a obtenção da curva analítica utilizou-se soluções padrão de glifosato na faixa de concentração de 40 mg L<sup>-1</sup> a 640 mg L<sup>-1</sup>. Os sinais transientes foram registrados e os valores de absorvância estão apresentados na Tabela 33 e graficamente estão apresentados na Figura 57.

**Tabela 33.** Concentração e valores de absorvância (495 nm) obtidos na construção da curva de calibração para a determinação de glifosato nas amostras de herbicidas comerciais por FIA.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Abs	DPR (%)*
40	0,02183	5,29
80	0,05150	1,94
160	0,1082	0,534
240	0,1628	0,355
320	0,2248	0,514
400	0,2848	0,405
480	0,3492	0,875
560	0,3952	0,387
640	0,4488	7,88

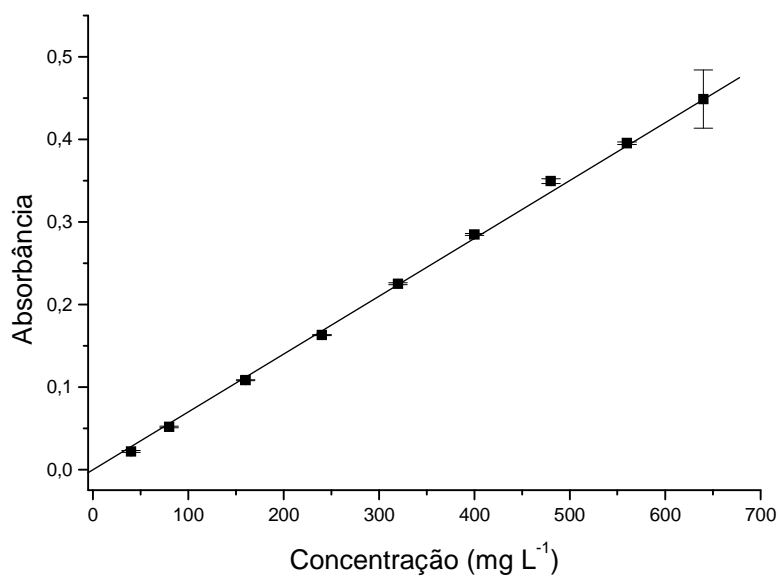
\* Desvio padrão relativo (n = 3).





**Figura 57.** Sinais transientes da curva analítica obtidos no sistema FIA.

A curva analítica utilizada no sistema FIA, obtida a partir dos sinais transientes, para a determinação de glifosato em amostras de herbicidas comerciais, está apresentada graficamente na Figura 58.



**Figura 58.** Curva analítica obtida empregando análise por injeção em fluxo por linha única.

A curva analítica (Figura 58) usada nas determinações de glifosato apresentou boa repetitividade e com isso um bom coeficiente de correlação linear ( $r = 0,999$ ), apesar da ampla faixa de concentração estabelecida. Os demais parâmetros instrumentais bem como as principais figuras de mérito estão sumarizados na Tabela 34.

**Tabela 34.** Parâmetros instrumentais e figuras de mérito obtidos para a aplicação do sistema FIA.

Parâmetros	
Absortividade molar	$121,9 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Faixa linear de trabalho	$40,0 \text{ mg L}^{-1}$ a $640 \text{ mg L}^{-1}$
Equação da reta	$A = - 0,00627 + 7,204 \times 10^{-4} \times C$
Coeficiente de correlação linear	0,999
Comprimento de onda	495 nm
Limite de detecção	$8,6 \text{ mg L}^{-1}$
Limite de quantificação	$28,7 \text{ mg L}^{-1}$
Repetibilidade intradia	$150 \pm 3,9 \text{ mg L}^{-1}$
Repetibilidade interdia	$150 \pm 1,2 \text{ mg L}^{-1}$
Frequencia analítica	$24 \text{ medidas hora}^{-1}$

### 8.1.2.3 – Estudo dos possíveis íons interferentes

Dentre os interferentes presentes nas formulações comerciais, os estudados foram na faixa de concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  a  $2 \text{ mg L}^{-1}$  e formaldeído, na faixa de  $150 \text{ mg L}^{-1}$  a  $320 \text{ mg L}^{-1}$ . Foi considerado efeito de interferência quando o sinal mostrou um erro maior que 3 % na determinação do glifosato.

Desta forma, nenhuma interferência foi observada na presença dessas substâncias quando em concentrações iguais ou até a concentração estudada.

#### 8.1.2.4 – Aplicação do método proposto

Devido à importância do glifosato na agricultura brasileira, alguns produtos de herbicidas comerciais de diferentes marcas foram selecionados para se avaliar a aplicação do método proposto. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 35.

**Tabela 35.** Determinação de glifosato em formulações comerciais.

Amostras	Teor de glifosato <sup>1</sup> (g L <sup>-1</sup> )	Teor de glifosato encontrado <sup>2</sup> (g L <sup>-1</sup> )	DPR <sup>3</sup> (%)
A		378,8	3,18
B	360	392,4	4,26
C		330,6	3,20
D <sup>4</sup>		274,6	1,22

<sup>1</sup> Teor de glifosato fornecido pelo fabricante.

<sup>2</sup> Média dos teores encontrado (n = 3).

<sup>3</sup> Desvio padrão relativo.

<sup>4</sup> Amostra diluída

#### 8.1.2.5 – Aplicação de métodos comparativo

Neste estudo, a determinação de glifosato nas amostras de herbicidas comerciais foram feitas empregando métodos espectrofotométricos, com medidas na região Vis (570 nm) e na região do UV (243 nm), conforme descrito na literatura<sup>38,119</sup>. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 36.

**Tabela 36.** Determinação de glifosato em formulações comerciais pelo método proposto e métodos espectrofotométricos.

Amostras	Teor de glifosato (g L <sup>-1</sup> )		
	Método Proposto	Método Espectrofotométrico	
		Região Vis (570 nm)	Região UV (243 nm)
A	378,8	405,5	390,2
B	392,4	440,8	388,8
C	330,6	213,9	250,3
D	274,6	174,2	217,1

Tratamento estatístico, empregando teste *t* de *student*, ao nível de 95% de confiança, foi realizado com os resultados obtidos na determinação do teor de glifosato nas amostras de herbicidas comerciais pelo método proposto e os métodos comparativos (Tabela 36). Comparando todos os resultados encontrados com o método proposto e ambos os métodos espectrofotométrico (Vis e UV) mostram que são significativamente diferentes, portanto não são concordantes entre si.

Considerando a medida espectrofotométrica na região do Vis (570 nm), estes resultados podem ser justificados devido à dificuldade na reprodutibilidade deste método<sup>38</sup>, uma vez que a faixa linear descrita no artigo (Figura 71 do Anexo 4) não corresponde com os sinais de absorbância obtidos experimentalmente (Figura 70 do Anexo 4).

Embora os resultados na determinação de glifosato tenham sido mais satisfatórios empregando a medida espectrofotométrica na região do UV (243 nm), exceto para a amostra C, estes resultados também foram significativamente diferentes, podendo ser devido às medidas ser realizada próxima a região de incerteza do espectro eletromagnético.

## 8.1.2.6 – Estudo de adição de padrão e recuperação

Para avaliar a eficiência e exatidão do método proposto, as amostras de herbicidas comerciais foram fortificadas para avaliar as possíveis interferências de matriz, empregando as concentrações de solução padrão de glifosato de 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 150 mg L<sup>-1</sup>. Cada amostra foi analisada em replicata (n = 3) e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 37.

**Tabela 37.** Resultados de recuperação de glifosato em formulações comerciais.

Amostras	Concentração adicionada (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração recuperada <sup>1</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
A	50	51,30	103
	100	107,0	107
	150	150,8	101
	200	309,4	101
B	50	174,2	110
	100	224,5	106
	150	282,9	109
	200	344,5	113
C	50	130,5	91,0
	100	176,4	91,4
	150	230,4	97,0
	200	262,3	88,7
D	50	126,1	98,5
	100	174,7	97,8
	150	221,8	96,6
	200	275,3	99,2

<sup>1</sup> Média das concentrações (n = 3).

A média de recuperação obtida foi na faixa de 88,7 a 113 %, com coeficiente de variação menor que 8 %. Estes dados indicam que apesar da presença de surfactante (polietoxietileno amina) nas amostras de herbicidas comerciais, a diluição estabelecida e as análises realizadas em pH 2,00 promoveram resultados de recuperação com boa precisão, devido ao efeito da matriz não serem significativos<sup>100</sup>.

### 8.1.3 – Conclusão

Os resultados obtidos mostraram um bom desempenho do método proposto para a análise de glifosato em formulações comerciais de herbicidas.

Embora o método proposto apresente absorvidade molar ( $121,9 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) inferior a dos métodos espectrofotométricos descritos na literatura<sup>38,119</sup>, a sensibilidade não é um fator ponderante haja vista que o glifosato está presente nas formulações comerciais em grandes quantidades, exigindo diluições para sua análise.

Adicionalmente, alguns métodos espectrofotométricos reportados na literatura apresentam como desvantagem a utilização de solventes tóxicos, como dissulfeto de carbono em meio de clorofórmio<sup>75</sup>, a necessidade de aquecimento a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  para promover a reação.

Desta forma, este estudo mostra a potencialidade do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para ser aplicado como um método alternativo atrativo na determinação direta de glifosato em amostras de herbicidas comerciais.

## 8.2 – EMPREGANDO SISTEMA EM FLUXO COM MULTI-BOMBAS

### 8.2.1 – Parte Experimental

#### 8.2.1.1 – Materiais e equipamentos

- ✓ Micropipetas da marca Eppendorf e Brand (100-1000  $\mu\text{L}$  e 10-100  $\mu\text{L}$ ), foram utilizadas para medir o volume das soluções.
- ✓ Balança analítica AG204 da marca Mettler Toledo, foi utilizada na pesagem das amostras e reagentes.
- ✓ Três micro-bombas solenóides (120SP1210 e 120SP1220, Bio-chem Valve Inc.) foram utilizadas para a propulsão e inserção das soluções no percurso analítico.
- ✓ Conectores e tubos de politetrafluoretileno (PTFE) com 0,8 mm de diâmetro interno e comprimentos variáveis foram empregados no sistema em fluxo com multi-bombas.
- ✓ Confluência de acrílico, com quatro vias foi empregada para a entrada e saída das soluções de amostra, reagente e carregadora.
- ✓ Espectrofotômetro Ocean optics da marca UBS 4000 UV-Vis, equipado com fibras ópticas (600 mm de diâmetro) e cela de fluxo (LWCC) de caminho óptico de 100 cm e volume interno de 250  $\mu\text{L}$  e fonte de luz com lâmpada de halogênio, LS-1-LL (ocean Optics).
- ✓ Sistema operacional para controle das micro-bombas foi utilizado um microcomputador equipado com uma interface eletrônica (PCL 711 Advantech interface card) para o desenvolvimento do Software Microsoft Quick Basic 4.5. A aquisição dos dados foi realizada usando um microcomputador contendo o Software Ocean Optics SpectraSuit.
- ✓ Um HPLC Jasco (PU 2080 Pump e FP 2020 Plus) equipado com injetor manual, coluna Phenomenex (Luna 5  $\mu\text{NH}_2$  100A, 250 x 4,6 mm) e detector fluorimétrico, foi utilizado na determinação de glifosato, em amostras de águas de consumo e águas naturais.

## 8.2.1.2 – Reagentes

- ✓ Glifosato (Sigma-Aldrich, 96 %)
- ✓ *p*-Dimetilaminocinamaldeído (Aldrich, 98 %)
- ✓ Ácido clorídrico (Merck, 37 %)
- ✓ Cloreto de cobre (BDH Reagents & Chemicals, 1000 µg mL<sup>-1</sup>)
- ✓ Cloreto de manganês (sigma, 99%)
- ✓ Nitrato de ferro (III) (Fluka, 1000 µg mL<sup>-1</sup>)
- ✓ Nitrato de alumínio (Fluka, 1000 µg mL<sup>-1</sup>)
- ✓ Nitrato de zinco (Fluka, 1000 µg mL<sup>-1</sup>)
- ✓ Sulfato de potássio (Riedel-de Haën, 99%)
- ✓ Bicarbonato de sódio (Merck, 99.5%)
- ✓ Borato de sódio (Merck, 99.5%)
- ✓ Oxalato de sódio (Riedel-de Haën, 99.5%)
- ✓ Hidrogenofosfato de potássio (Riedel-de Haën, 99.5%)
- ✓ Nitrato de sódio (Sigma-Aldrich, 99.5%)
- ✓ Nitrito de sódio (Riedel-de Haën, 99%)
- ✓ Etilenodiamina (Merck, 99%)
- ✓ Dibutilamina (Merck, 99%)
- ✓ Glufosinate (Fluka analytical, 100 mg)
- ✓ Ácido aminometilfosfônico (Aldrich chemistry, 99%)
- ✓ Acetonitrila (Merck, grau cromatográfico)
- ✓ Borato de sódio (Synth, P. A.)
- ✓ 9-fluorenil-metilcloroformato (Fluka, P. A.)



### 8.2.1.3 – Preparo das soluções

#### 8.2.1.3.1 – Solução de *p*-DAC (226 mg L<sup>-1</sup>)

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de *p*-DAC de concentração de 680 mg L<sup>-1</sup> em HCl 0,0200 mol L<sup>-1</sup>, a partir da pesagem de 34,0 mg de *p*-DAC e transferiu-se para um balão de 50,00 mL. Em seguida adicionou-se 2,50 mL de HCl padronizado (0,400 mol L<sup>-1</sup>) e completou-se o volume com água deionizada.

A solução de *p*-DAC 226 mg L<sup>-1</sup> foi preparada empregando alíquota de 8,33 mL da solução de *p*-DAC estoque (226 mg L<sup>-1</sup>) e transferida para balão de 25,00 mL, e completado o volume com solução HCl 1,00 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, para evitar a reprecipitação do *p*-DAC.

#### 8.2.1.3.2 – Soluções padrão de glifosato

O planejamento experimental, realizado para a obtenção das condições ótimas de trabalho, foi feito utilizando concentração de solução padrão de glifosato de 4,05 mg L<sup>-1</sup>. Esta solução foi preparada a partir da diluição da solução padrão de glifosato de 50,6 mg L<sup>-1</sup> e de 506 mg L<sup>-1</sup> preparada a partir da pesagem de 25,3 mg em balão de 50,00 mL.

Para a obtenção da curva analítica, as soluções padrão de trabalho utilizadas na determinação de glifosato foram preparadas mediante diluições adequadas da solução estoque de 50,6 mg L<sup>-1</sup> para a obtenção das seguintes soluções de concentrações finais de 0,51; 2,0; 4,1; 6,1; 8,1 e 10,1 mg L<sup>-1</sup>.

#### 8.2.1.3.3 – Soluções tampão de borato de sódio (0,0500 mol L<sup>-1</sup>)

Esta solução foi preparada a partir da pesagem de 0,9538 g de borato de sódio e diluído para aproximadamente 40,00 mL. O pH desta solução foi medido (pH 10,27) e este alterado para 10,40 utilizando solução de KOH (3,01 mol L<sup>-1</sup>) e completou-se o volume da solução para 50,00 mL com água deionizada.

#### 8.2.1.3.4 – Solução de 9-metilcloroformato ( $1,00 \text{ g L}^{-1}$ )

Para o preparo desta solução, pesou-se, aproximadamente, 10,0 mg de 9-fluorenil-metilcloroformato (FMOC-Cl) que foi dissolvido e transferido para um balão volumétrico de 10,00 mL com acetonitrila e completou-se o volume com este solvente.

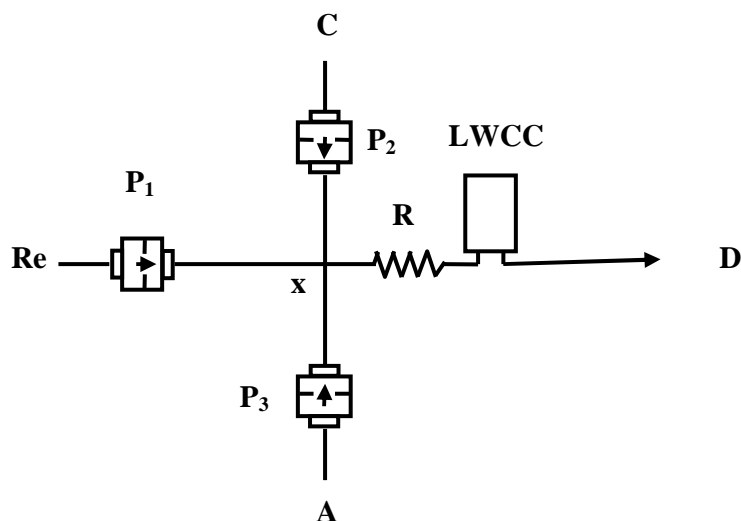
#### 8.2.1.3.5 – Solução da fase móvel empregado em HPLC

No preparo da solução tampão de fosfato 0,750 %, foi pesado 7,5030 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e esta massa transferida para um béquer. Após a dissolução e diluição da massa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , para um volume de aproximadamente 500,00 mL, o pH desta solução foi ajustado para 5,80 empregando solução de KOH  $3,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

Após o ajuste do pH, a solução foi transferida para um balão de 1,00 L e adicionou-se, aproximadamente 410,00 mL de acetonitrila e completou-se o volume com água deionizada. Em seguida, a solução foi filtrada à vácuo utilizando de filtro de acetato de celulose  $0,45 \mu\text{m}$ . A solução foi transferida para um frasco âmbar e semi-aberto e foi colocado em banho de ultrassom, para a desgaseificação por um período de 15 minutos e em seguida, armazenado em geladeira.

#### 8.2.1.4 – Metodologia empregada

O módulo de análise do sistema em fluxo, empregado neste estudo para a determinação de glifosato, foi feito utilizando três micro-bombas ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ) para a inserção e propulsão das soluções envolvidas na reação (Figure 59).



**Figura 59.** Diagrama de fluxo do sistema MPFS usado na determinação de glifosato. A: amostra; Re: reagente; C: solução carregadora; P<sub>i</sub>: micro-bombas; x: ponto de confluência; R: reator (190 cm); LWCC: célula de fluxo e D: descarte.

Inicialmente, as micro-bombas P<sub>1</sub> e P<sub>3</sub> foram acionadas para inserção das soluções de amostra e reagente, respectivamente.

Neste estudo, a inserção de alíquotas destas soluções foi feita empregando o modo de amostragem binária<sup>121</sup> por proporcionar melhor mistura entre as soluções e conseqüentemente, menor efeito de dispersão.

Desta forma, quando a micro-bomba P<sub>1</sub> foi ativada, ou desativada, a micro-bomba P<sub>3</sub> foi mantida desativada, ou ativada. Após a inserção do volume pré-estabelecido, as soluções foram transportadas e mantidas no reator, por um determinado tempo, através da técnica de parada de fluxo<sup>122</sup>. Em seguida, enquanto as micro-bombas P<sub>1</sub> e P<sub>3</sub> foram desativadas, a micro-bomba P<sub>2</sub> foi acionada para a inserção da solução carregadora e transporte da mistura reacional para o detector, na célula de fluxo, onde o sinal transiente de absorvância ( $\lambda_{\text{máx}}$  495 nm) foi registrado. Após o registro do valor máximo de absorvância, o sistema retorna a posição de fase 1, iniciando novamente outro ciclo de medidas.

Na Tabela 38 está descrito o procedimento experimental estabelecido na inserção das soluções utilizadas.

**Tabela 38.** Procedimento automático.

Fase	Bomba	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Número de pulso	Pulso (frequência/ $\text{min}^{-1}$ )	Ação
1	P <sub>1</sub> /P <sub>3</sub>	10/20	20	30	Introdução das soluções de amostra e reagente por meio de amostragem binária
2	-	-	-	0	Parada de fluxo de 180 segundos
3	P <sub>2</sub>	20	100	30	Transporte da mistura reacional da célula de fluxo e registro do sinal transiente

### 8.2.1.5 – Planejamento experimental

Após a identificação dos parâmetros significativos, as variáveis foram otimizadas empregando análises quimiométricas por meio de planejamento fatorial fracionário ( $2^{9-5}$ ) para a obtenção das condições ótimas de análise. As variáveis estudadas foram: comprimento do reator, número de pulso e intervalo de pulso das micro-bombas (soluções de amostra, reagente e carregadora) concentração de *p*-DAC e HCl (solvente e solução carregadora) e tempo de parada de fluxo. A Tabela 39 apresenta os níveis pré-estabelecidos para cada variável estudada.

**Tabela 39.** Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental  $2^{9-5}$ .

Variável		Níveis	
		-1	+1
CR	Comprimento do reator	100 cm	190 cm
IC	Intervalo de pulso (Solução carregadora)	1 s	2 s
NC	Número de pulso (Solução carregadora)	40 pulsos	80 pulsos
IAR	Intervalo de pulso (amostra/reagente)	1 s	2 s
NAR	Número de pulso (amostra/reagente)	10 pulsos	20 pulsos
C <sub>p</sub> -DAC	Concentração de <i>p</i> -DAC	30,0 mg L <sup>-1</sup>	60,0 mg L <sup>-1</sup>
CHCl/So	Concentração de HCl (solvente)	1,00x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>	1,00x10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup>
CHCl/Ca	Concentração de HCl (solução carregadora)	1,00x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>	1,00x10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup>
PF	Tempo de parada de fluxo	90 s	180 s

A matriz experimental, codificada, empregando as variáveis e seus respectivos níveis, está descrita na Tabela 40. Na realização deste planejamento, foram necessários 16 experimentos, em triplicata, empregando matriz randomizada.

**Tabela 40.** Matriz utilizada no planejamento fatorial fracionário ( $2^{9-5}$ ).

Ensaio	Variáveis								
	CR	IC	NC	IAR	NAR	C <sub>p</sub> -DAC	CHCl/So	CHCl/Ca	PF
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

### 8.2.1.6 – Estudo de íons interferentes

O estudo do efeito dos íons interferentes, no sinal analítico, foi feito adicionando concentrações diferentes deste à solução padrão de glifosato contendo  $4,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Os cátions  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  na faixa de concentração de  $5,00 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  a  $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , e os cátions  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  foram estudados na faixa de concentração de  $5,00 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  a  $300 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

Os ânions de  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  e  $\text{NO}_3^-$  foram estudados na faixa de concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  a  $600 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$  foram estudados na faixa de concentração de  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$  a  $400 \text{ mg L}^{-1}$ . Já o íon  $\text{CO}_3^{2-}$  foi estudado na faixa de concentração de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  a  $400 \text{ mg L}^{-1}$  e  $\text{NO}_2^-$  foi estudado na faixa de concentração de  $40,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  a  $400 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

Outras espécies interferentes estudadas foram grupos aminas empregando etilenodiamina e dibutilamina na mesma faixa de concentração do  $\text{NO}_2^-$  ( $40,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  a  $400 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ). Glufosinato e ácido aminometilfosfônico, também, foram estudados na faixa de concentração de  $0,500 \text{ mg L}^{-1}$  a  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 8.2.1.7 – Aquisição e preparo das amostras para análise

As amostras empregadas neste trabalho foram amostras de água destinada ao consumo humano foram adquiridas em supermercados de Porto (Portugal). As amostras de água naturais (fonte e rio) foram coletadas na região norte de Portugal.

##### 8.2.1.7.1 – Preparo das amostras para análise por fluxo

Conforme a necessidade, as amostras foram filtradas, em membranas microporosas de acetato de celulose de  $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ , e estocadas em refrigerador à temperatura de aproximadamente  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ , em frascos de polietileno.

No ensaio de adição de padrão e recuperação, as amostras foram fortificadas com  $2,02$ ;  $4,05$  e  $6,07 \text{ mg L}^{-1}$  de solução padrão de glifosato.

##### 8.2.1.7.2 – Preparo das amostras para análise pelo método oficial

Um procedimento analítico empregando HPLC com derivatização pré-coluna, padronização externa e detecção por fluorescência foi empregado na determinação de glifosato em amostras de água de consumo e águas naturais.

Neste procedimento, a derivatização foi feita empregando 9-metilcloroformato (FMOC-Cl), agente derivatizante e separação em coluna de fase reversa. Neste estudo, a etapa de derivatização foi realizada de acordo com Le Bot *et al.*<sup>68</sup>, conforme procedimento descrito a seguir.

Para o preparo das amostras de água para análise empregando HPLC, 20,00 mL destas tiveram o pH corrigidos para 2,00, com solução de HCl de concentração de 0,400 mol L<sup>-1</sup>, em um béquer de 50,0 mL. Após 1 h da solução em pH ácido, para a protonação da molécula de glifosato (Figura 8), este foi alterado para pH 6,00 empregando solução de KOH 0,400 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 25,00 mL e completado o volume com água deionizada. A solução de trabalho foi preparada a partir de alíquota de 0,25 mL desta solução e diluída para um balão volumétrico de 50,00 mL.

Para a derivatização do glifosato, 3,00 mL da solução de trabalho foi colocada em um tubo de vaio e a este adicionado 0,500 mL de solução tampão de borato de sódio (pH = 10,40) e 0,500 mL de solução de FMOC-Cl (1,00 g L<sup>-1</sup>). Esta solução foi agitada manualmente por cerca de 1 h.

A extração do glifosato derivatizado foi feita empregando 2,00 mL de dietil éter e as soluções misturadas vagorosamente. Após a separação das fases e com o auxílio de uma seringa, alíquota de 1,00 mL de extrato foi retirada e este transferido para outro tubo de vaio com o auxílio de um filtro. Em seguida, o tubo de vaio contendo o extrato foi mantido em capela para garantir a evaporação total do dietil éter e injetado em HPLC e a detecção dos compostos eluídos foi feita em  $\lambda_{\text{máx}}$  260 nm e  $\lambda_{\text{máx}}$  310 nm, conforme mencionado por Ibáñez *et al.*<sup>61</sup>.

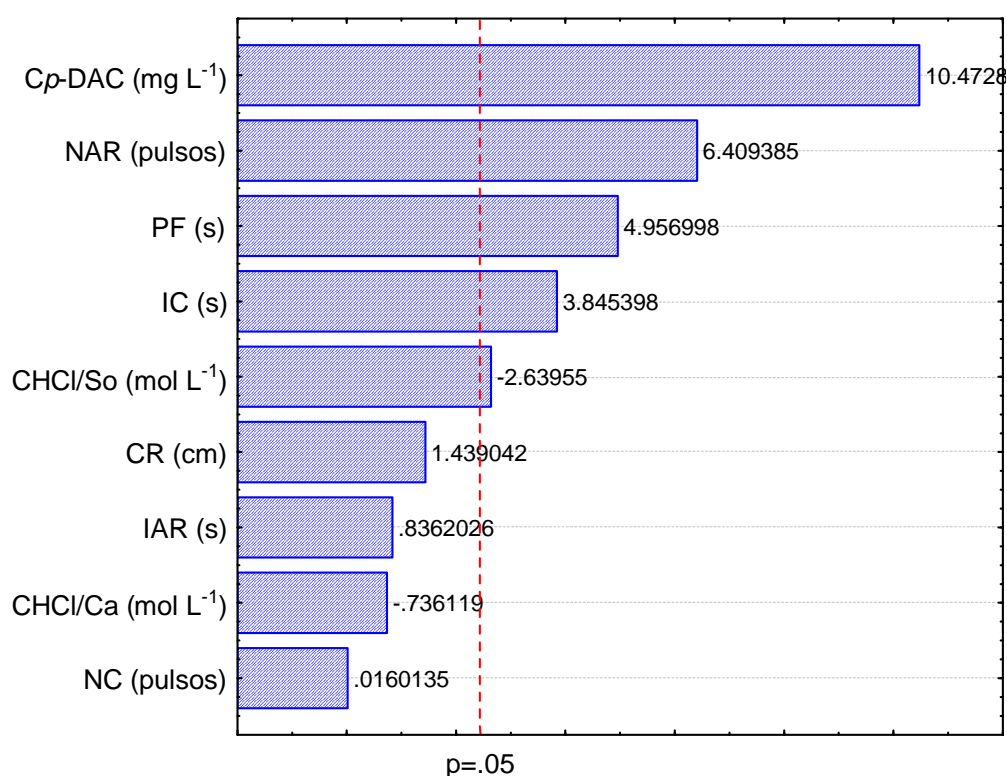
### 8.2.2 – Resultados e Discussão

Neste sistema, a inserção das soluções empregando amostragem binária, combinada com a utilização da técnica de parada de fluxo, devido à cinética lenta da reação, bem como uma célula de fluxo de longo caminho óptico melhorou significativamente a sensibilidade do método proposto.



### 8.2.2.1 – Otimização das condições experimentais

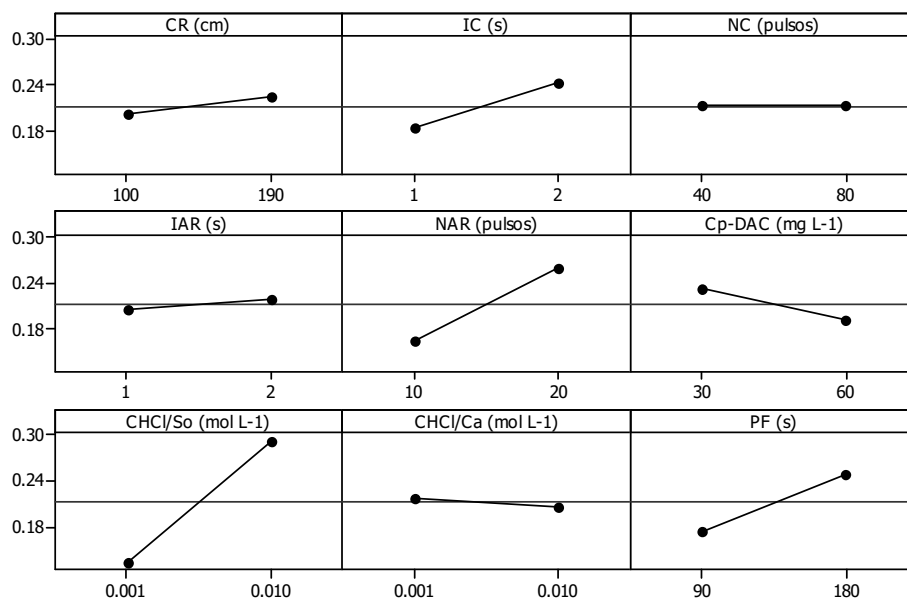
Após a triagem das variáveis físicas e químicas envolvidas na reação, estas foram otimizadas a partir de níveis estabelecidos em testes preliminares. Neste ensaio, foram realizados dezesseis experimentos e a média dos valores de absorbância (495 nm) estão apresentados graficamente nas Figuras 60 a 62.



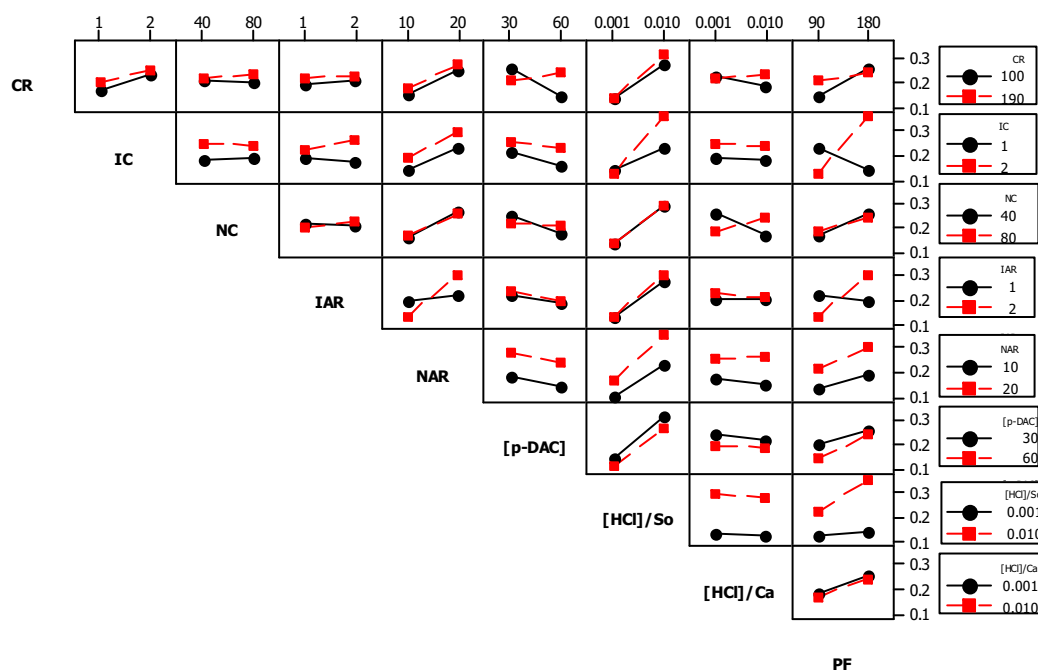
**Figura 60.** Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial fracionário ( $2^{9-5}$ ).

O gráfico de Pareto obtido com os ensaios do planejamento fatorial fracionário (Figura 60) mostra que as variáveis concentração de HCl (CHCl) tanto como solvente como solução carregadora, comprimento do reator, (CR), intervalo de pulso das soluções amostra e reagente (IAR), número de pulsos da solução carregadora (NC), foram as variáveis que menos influenciaram na reação, uma vez que a influencia destas no sinal analítico foram menos que 5%, considerando nível de confiança de 95%.

Desta forma, a combinação de 80 pulsos para a solução carregadora, 2 segundos para intervalo de pulso das soluções de amostra e reagente, 190 cm para comprimento do reator,  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de HCl para concentração da solução de reagente (solvente) e solução carregadora foram empregadas.



**Figura 61.** Gráficos dos efeitos principais das variáveis obtido no planejamento fatorial fracionário  $2^{9-5}$ .



**Figura 62.** Gráficos dos efeitos de interações entre as variáveis obtido no planejamento fatorial fracionário ( $2^{9-5}$ ).

Neste sistema, as variáveis com efeitos mais significativos foram concentração de *p*-DAC (*C<sub>p</sub>*-DAC), intervalo de pulso das soluções de amostra e reagente (IAR), tempo de parada de fluxo (PF) e intervalo de pulso da solução carregadora (IC). De acordo com os gráficos de Pareto (Figura 60) e de efeitos principais (Figura 61), embora maior sensibilidade analítica poderia ser obtida empregando valores maiores de condições experimentais, para este sistema não é vantajoso, uma vez que o mesmo apresentaria baixa frequência analítica bem como altos valores de desvios entre as medidas.

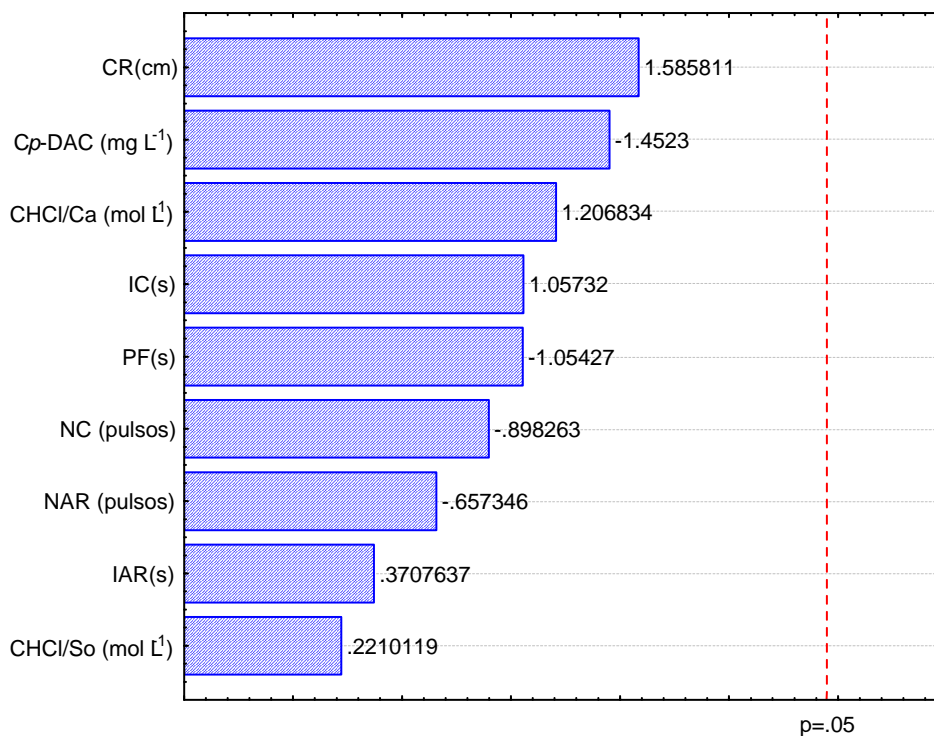
Portanto, essas variáveis foram fixadas no seu nível positivo ou seja, 60,0 mg L<sup>-1</sup> para concentração de *p*-DAC, 20 pulsos para o intervalo de pulso das soluções de amostra e reagente, 180 segundos para tempo de parada de fluxo e 2 segundos para intervalo de pulso da solução carregadora.

A Tabela 41 apresenta as variáveis com as condições otimizadas neste planejamento experimental.

**Tabela 41.** Variáveis estudadas com suas respectivas condições experimentais otimizadas pelo planejamento fatorial fracionário ( $2^{9-5}$ ).

	Variáveis	Condição adotada
CR	Comprimento do reator	190 cm
IC	Intervalo de pulso (Solução carregadora)	2 s
NC	Número de pulso (Solução carregadora)	80 pulsos
IAR	Intervalo de pulso (amostra/reagente)	1 s
NAR	Número de pulso (amostra/reagente)	20 pulsos
$C_p$ -DAC	Concentração de $p$ -DAC	60,0 mg L <sup>-1</sup>
CHCl/So	Concentração de HCl (solvente)	1,00 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>
CHCl/Ca	Concentração de HCl (solução carregadora)	1,00 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>
PF	Tempo de parada de fluxo	180 s

Durante a realização dos ensaios de planejamento experimental foi observado que algumas combinações dos níveis pré-estabelecido e as variáveis estudada promoveram instabilidade da linha base e, conseqüentemente, altos valores de desvio padrão. A Figura 63 mostra o gráfico de Pareto em função do desvio padrão de cada experimento.



**Figura 63.** Gráfico de Pareto em função dos desvios experimentais ( n = 3).

De acordo com a Figura 63, as variáveis que mais influencia no desvio padrão das medidas são: comprimento do reator, concentração de *p*-DAC e concentração de HCl como solução carregadora. Isto se deve provavelmente devido a limpeza ineficiente do reator a medida que aumenta a concentração de *p*-DAC no sistema. Portanto, a concentração de HCl foi fixada no seu nível +1 ( $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) e o intervalo de pulso desta solução fixada em 100 pulsos.

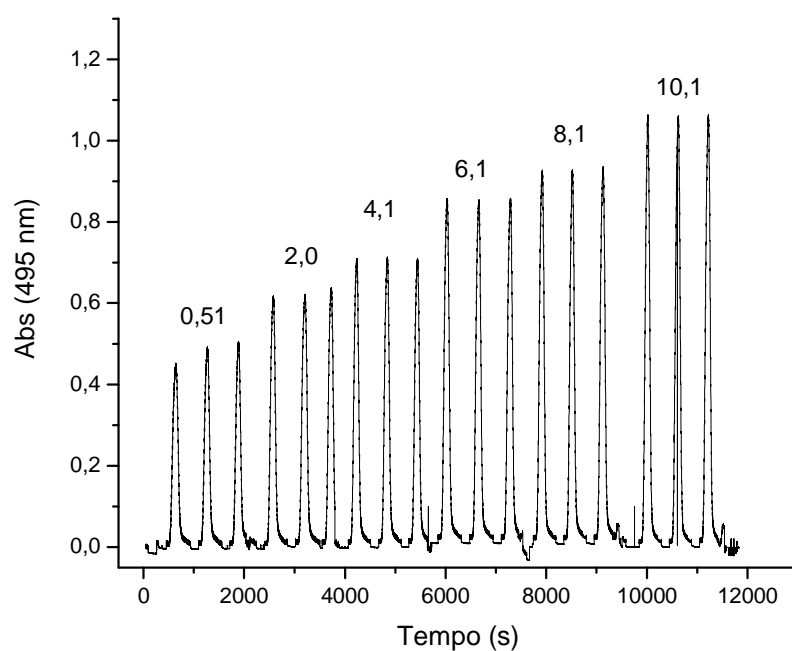
#### 8.2.2.2 – Curva analítica e validação do método proposto

Para a obtenção da curva analítica utilizou-se soluções padrão de glifosato nas seguintes concentrações: 0,51; 2,0; 4,1; 6,1; 8,1 e 10,1 mg L<sup>-1</sup>. Os sinais transientes foram registrados e os valores de absorvância estão apresentados na Tabela 42 e na Figura 64.

**Tabela 42.** Concentração e valores de absorvância (495 nm) obtidos por MPFS, na determinação de glifosato nas amostras de águas naturais e de consumo humano.

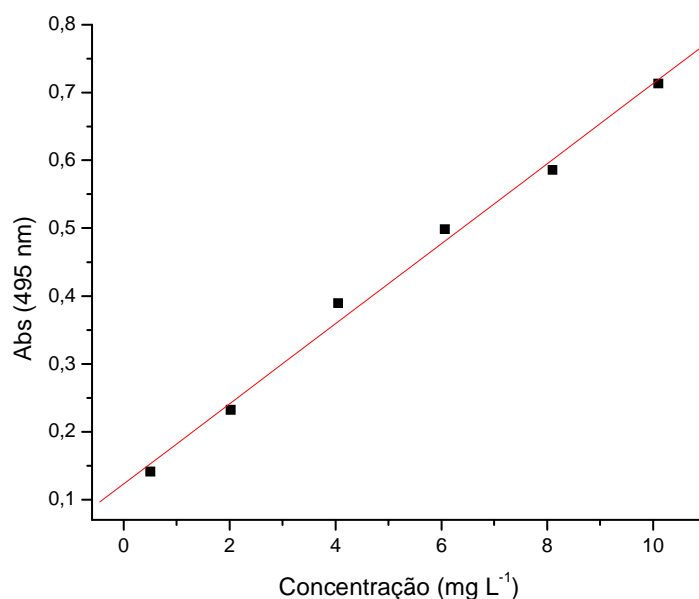
Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Abs	DPR (%)*
0,51	0,1410	3,09
2,0	0,2320	2,76
4,1	0,3891	0,257
6,1	0,4983	2,78
8,1	0,5857	5,36
10,1	0,7129	1,20

\* Desvio padrão relativo (n = 3).



**Figura 64.** Sinais transientes da curva analítica obtidos no sistema de multi-bombas.

A curva analítica utilizada no sistema em fluxo empregando multi-bombas, obtida a partir dos sinais transientes, para a determinação de glifosato em amostras de águas naturais e de consumo, está apresentada graficamente na Figura 65.



**Figura 65.** Curva analítica obtida empregando sistema em fluxo com multi-bombas.

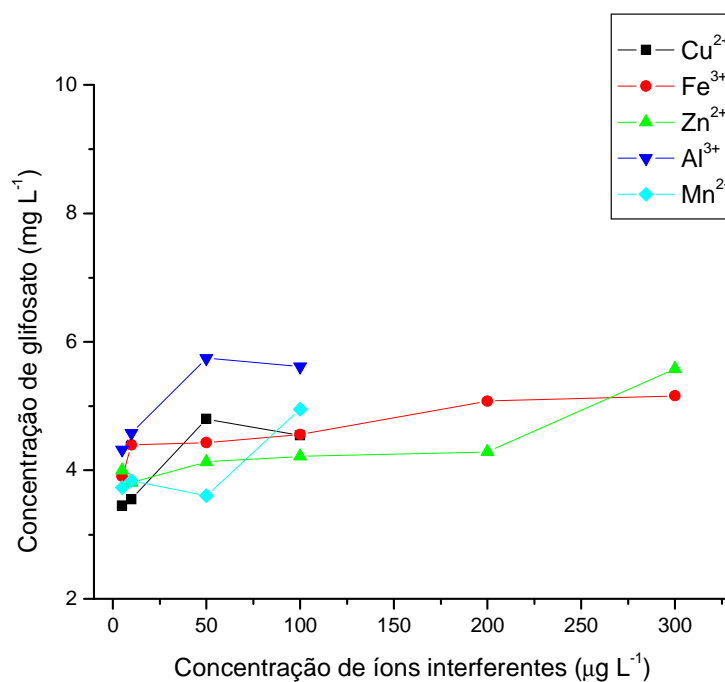
A curva analítica (Figura 65) usada nas determinações de glifosato apresentou boa repetitividade e com isso um bom coeficiente de correlação linear ( $r = 0,996$ ), apesar da ampla faixa de concentração estabelecida. Os demais parâmetros instrumentais bem como as principais figuras de mérito estão sumarizados na Tabela 43.

**Tabela 43.** Parâmetros instrumentais e figuras de mérito obtidos para a aplicação do sistema MPFS .

Parâmetros	
Faixa linear de trabalho	0,51 mg L <sup>-1</sup> a 10,1 mg L <sup>-1</sup>
Equação da reta	$A = 0,1229 + 0,05954 \times C$
Coeficiente de correlação linear	0,996
Comprimento de onda	495 nm
Limite de detecção	0,17 mg L <sup>-1</sup>
Limite de quantificação	0,53 mg L <sup>-1</sup>
Repetibilidade intradia	4,1 ± 0,18 mg L <sup>-1</sup>
Repetibilidade interdia	4,1 ± 0,29 mg L <sup>-1</sup>
Frequencia analítica	6 medidas hora <sup>-1</sup>

## 8.2.2.3 – Estudo dos íons interferentes

A possível interferência de vários cátions, tais como  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e ânions como  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ , glufosinato e seu principal metabolito (AMPA) foram avaliados. Neste estudo, soluções contendo  $4,1 \text{ mg L}^{-1}$  de glifosato e cada uma das espécies interferentes foram feitas separadamente em diferentes faixa de concentração e analisadas de acordo com o procedimento recomendado. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 66 a 68.



**Figura 66.** Estudo dos possíveis cátions interferentes empregando MPFS.



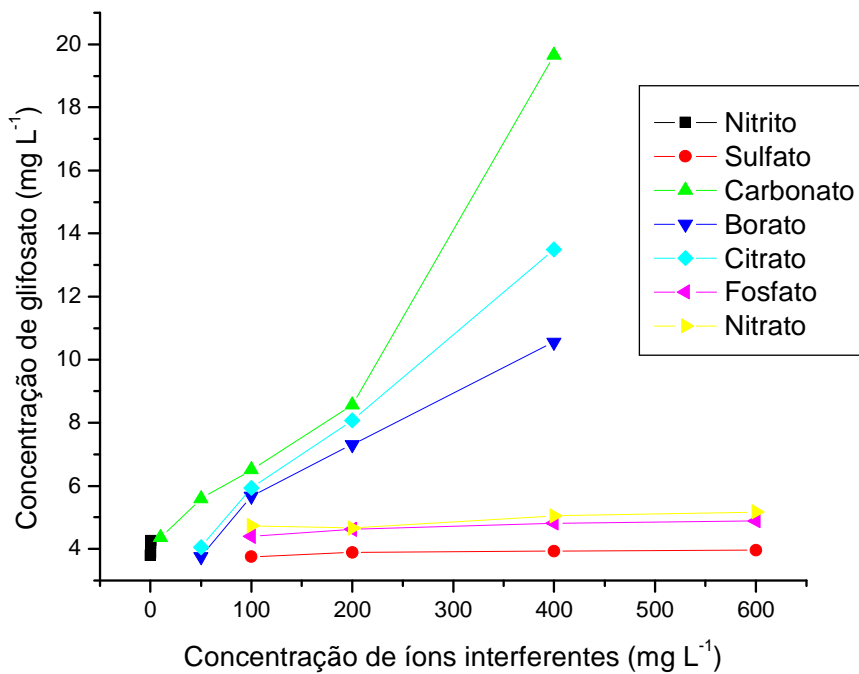


Figura 67. Estudo dos possíveis ânions interferentes empregando MPFS.

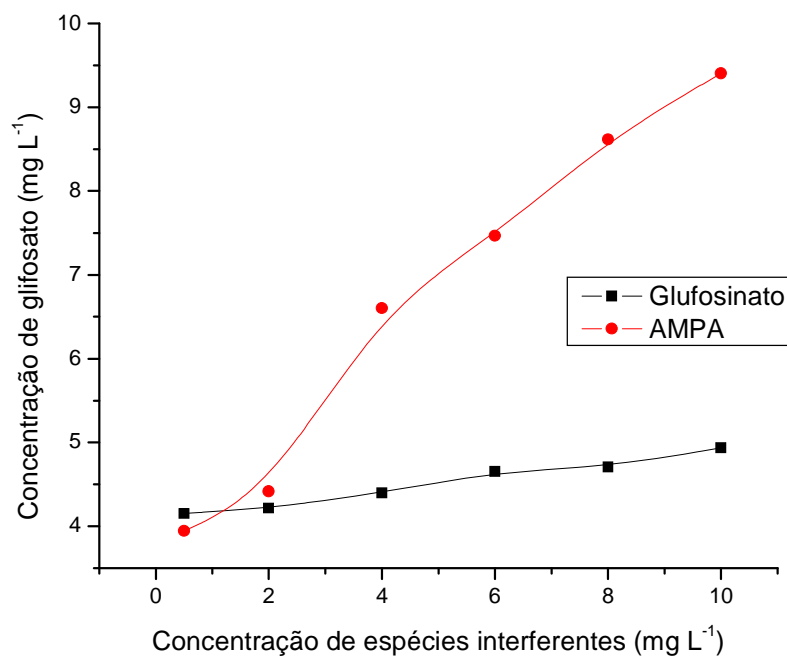


Figura 68. Estudo de glufosinato e AMPA como possíveis interferentes empregando MPFS.

Os resultados obtidos mostraram que os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  podem interferir na reação se presente em concentrações maior que  $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto que o íon  $\text{Mn}^{2+}$  somente acima de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os íons  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  também podem interferir na reação se presentes em concentrações maiores que  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Os íons  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$  podem interferir na reação se presente em concentrações maiores que  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Já o íon  $\text{CO}_3^{2-}$  somente se presente em concentrações maiores que  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Os demais íons ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$ ), na faixa de concentração estudada, não foi observada efeito de interferência na reação.

O ácido aminometilfosfônico (AMPA) e glufosinato foram também estudados como possíveis espécies interferentes. Os resultados obtidos (Figura 68) mostraram que tanto o AMPA quanto o glufosinato podem interferir na reação se presentes em concentrações maiores que  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

A Tabela 44 apresenta os limites toleráveis para as concentrações das espécies interferentes estudadas que causam erros de  $\pm 3 \%$ , na determinação de glifosato empregando sistema em fluxo com multi-bombas.

**Tabela 44.** Efeito das espécies interferentes em amostras de águas (naturais e de consumo humano) contendo  $4,1 \text{ mg L}^{-1}$  de solução padrão de glifosato.

Espécies interferentes	Concentração máxima das espécies sem efeito de matriz ( $\text{mg L}^{-1}$ ) *
$\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{NO}_3^-$	$600 \text{ mg L}^{-1}$
$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ e $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$	$50,0 \text{ mg L}^{-1}$
Glufosinato	$4,00 \text{ mg L}^{-1}$
AMPA	$2,00 \text{ mg L}^{-1}$
$\text{NO}_2^-$	$0,40 \text{ mg L}^{-1}$
$\text{Zn}^{2+}$	$0,20 \text{ mg L}^{-1}$
$\text{Fe}^{3+}$	$0,10 \text{ mg L}^{-1}$
$\text{Mn}^{2+}$	$0,05 \text{ mg L}^{-1}$
$\text{Cu}^{2+}$ e $\text{Al}^{3+}$	$0,01 \text{ mg L}^{-1}$

\* Limite de concentração causado pelo erro de  $\pm 3 \%$  de desvio.

#### 8.2.2.4 – Aplicação do método proposto

Para avaliar a eficiência do método proposto em amostras reais, este método foi aplicado na determinação de glifosato em amostras de água de consumo e águas naturais (águas de fonte e águas de rio). Os resultados obtidos mostraram que dentre as amostras estudadas uma amostra de água de rio apresentou teor de glifosato de  $2,25 \text{ mg L}^{-1}$ . As demais amostras elencadas apresentaram concentração de glifosato menores que o limite de detecção ( $0,17 \text{ mg L}^{-1}$ ).

##### *8.2.2.4.1 – Adição de padrão e recuperação*

Para avaliar o efeito de matriz foi realizado teste de adição de padrão e recuperação. Neste estudo, as amostras de águas de consumo, de fontes e de rios foram fortificadas com concentrações de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $4,1 \text{ mg L}^{-1}$  e  $6,1 \text{ mg L}^{-1}$  de solução estoque de glifosato. Cada análise foi realizada em triplicata ( $n = 3$ ) e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 45.

**Tabela 45.** Resultados de recuperação de glifosato adicionado nas amostras de água empregando MPFS.

Amostras	Concentração adicionada (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração recuperada <sup>1</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
Água de consumo (1)	2,0	1,86	93,1
	4,1	3,54	86,3
	6,1	5,56	91,1
Água de consumo (2)	2,0	1,91	95,5
	4,1	3,58	87,3
	6,1	5,84	95,7
Água de Fonte (1)	2,0	2,06	103
	4,1	4,16	101
	6,1	5,60	91,8
Água de Fonte (2)	2,0	1,93	96,5
	4,1	3,71	90,5
	6,1	5,41	88,7
Água de rio (1)	2,0	1,79	89,5
	4,1	3,57	87,1
	6,1	5,85	95,9
Água de rio (2)	2,0	2,09	105
	4,1	4,10	100
	6,1	5,66	92,9

<sup>1</sup> Média das concentrações (n = 3).

A média de recuperação obtida foi na faixa de 86,3 a 105 %, com desvio padrão relativo menor que 7,6 %. Esses dados mostraram boa faixa de recuperação e boa precisão do método, indicando que para determinação de glifosato o efeito de matriz no sinal analítico pode ser considerado insignificante.

## 8.2.2.5 – Aplicação do método oficial

Neste estudo, a precisão do método também foi avaliada empregando a determinação de glifosato, nas amostras de águas elencadas, pelo método oficial (AOAC International)<sup>69</sup>. Desta forma, a análise para a confirmação dos resultados foi feito utilizando a técnica de HPLC com derivatização pré-coluna e detecção por fluorescência.

As amostras não fortificadas e fortificadas com glifosato (2,0 mg L<sup>-1</sup>) foram analisadas tanto pelo método oficial (HPLC) quanto o método proposto (MPFS), para reduzir a influencia do efeito de matriz. Desta forma, para a aplicação dos dois métodos as amostras foram analisadas diretamente usando MPFS. Para a aplicação do método oficial, as amostras foram diluídas 200 vezes, para a obtenção da concentração de glifosato de 10,0 µg L<sup>-1</sup>, antes da etapa de derivatização. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 46.

**Tabela 46.** Resultados obtido pelo método proposto (MPFS) e método oficial (HPLC) na determinação de glifosato em amostras de água.

Amostras		HPLC (mg L <sup>-1</sup> )	MPFS (mg L <sup>-1</sup> )
Água de consumo (1)	(NF)	< 0,2	(-)
	(F)	1,90 ± 0,03	(+) 1,70 ± 0,10
Água de consumo (2)	(NF)	< 0,2	(-)
	(F)	1,16 ± 0,03	(+) 1,88 ± 0,11
Água de Fonte (1)	(NF)	< 0,2	(-)
	(F)	1,86 ± 0,06	(+) 1,70 ± 0,10
Água de Fonte (2)	(NF)	< 0,2	(-)
	(F)	2,10 ± 0,06	(+) 2,04 ± 0,12
Água de rio (1)	(NF)	< 0,2	(+) < LOQ
	(F)	2,04 ± 0,06	(+) 2,16 ± 0,13
Água de rio (2)	(NF)	< 0,2	(-)
	(F)	2,08 ± 0,06	(+) 2,32 ± 0,14

NF, não fortificada; F, fortificada.

Comparando estatisticamente, os resultados obtidos pelo método oficial com os resultados obtidos pelo método proposto (Tabela 46) mostram que o teor de glifosato obtido por ambos os métodos foram bastante concordantes entre si, indicando que o método proposto pode ser empregado na determinação de glifosato, uma vez que este é uma ferramenta bastante viável como um método rápido de *screening*, para a detecção de glifosato em baixos níveis de concentração.

### 8.2.3 – Conclusão

Um método simples de *screening* foi desenvolvido para a determinação de glifosato em amostras de água usando sistema em fluxo empregando multibombas.

A Legislação dos Estados Unidos (US EPA 1994) estabelece o limite máximo de glifosato permitido em água destinada ao consumo humano de  $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ . A Legislação Brasileira (Portaria nº 518 MS 2004) estabelece o limite máximo de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de glifosato<sup>43</sup>.

Desta forma, o método proposto mostrou-se bastante viável na determinação do teor de glifosato em amostras de água, por ter apresentado boa exatidão e não apresentar efeitos de matriz. Além disso, o método proposto apresentou limite de detecção e de quantificação de  $0,17 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,53 \text{ mg L}^{-1}$ , portanto, sensível suficiente para atender algumas legislações ambientais.

## 9 – CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, os resultados obtidos, na determinação do teor de glifosato, mostram um bom desempenho na aplicação da espectroscopia de reflectância difusa bem como na aplicação dos sistemas em fluxo, empregando análise por injeção em fluxo (FIA) e sistema em fluxo com multi-bombas (MPFS). Portanto, são alternativas vantajosas em relação aos métodos existentes na literatura.

De acordo com os dados obtidos, a frequência analítica obtida empregando o sistema FIA foi de aproximadamente 24 medidas por hora, enquanto que empregando o sistema com multi-bombas foi de aproximadamente 6 medidas por hora, devido a utilização da técnica de parada de fluxo, amostragem binária e cela de fluxo de longo caminho óptico e, conseqüentemente, maior sensibilidade atingida por este sistema

Além disso, para a análise das amostras de herbicidas comerciais utilizadas na determinação de glifosato por FIA bem como as amostras de águas utilizadas na determinação de glifosato por MPFS não houve necessidade de etapas de pré-tratamento e requer baixo consumo amostra, as quais foram 0,25 mL e 0,20 mL por determinação, respectivamente.

Embora os resultados obtidos na análise de glifosato empregando FIA e os métodos espectrofotométricos tenham sido significativamente diferentes, ao nível de 95 % de confiança, o método foi considerado exato devido a boa faixa de recuperação obtida (88,7 % a 113 %)

Considerando as amostras de herbicidas comerciais, o elevado teor de glifosato presente nessas amostras, pode-se concluir que a espectroscopia de reflectância difusa pode ser empregada, na determinação de glifosato tanto em amostras de herbicidas comerciais quanto em amostras de águas naturais e de consumo humano.

O limite de detecção e de quantificação obtido por espectroscopia de reflectância difusa foi de 7,3 mg L<sup>-1</sup> e de 21,8 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Empregando os sistemas em fluxo, os limites de detecção foram de 8,6 mg L<sup>-1</sup> e 0,17 mg L<sup>-1</sup> e de quantificação de 28,7 mg L<sup>-1</sup> e 0,53 mg L<sup>-1</sup>, para FIA e MPFS, respectivamente.

---

Portanto, embora o sistema em fluxo com multi-bombas tenha apresentado maior sensibilidade em relação aos métodos propostos (FIA e reflectância difusa), a aplicação da espectroscopia de reflectância difusa também foi satisfatória, pois este método foi suficientemente sensível para a determinação de glifosato nas amostras de águas contendo baixíssimo teor de glifosato, embora seja necessário a pré-concentração das amostras de águas estudadas.

Desta forma, a espectroscopia de reflectância difusa bem como os sistemas em fluxo (FIA e MPFS) são métodos de análise que têm despertado interesse em relação a outros métodos analíticos, por apresentarem vantagens como, por exemplo, sensibilidade, seletividade, versatilidade, facilidade, simplicidade, rapidez e baixo custo operacional.

No emprego da espectroscopia de reflectância difusa, além das vantagens já mencionadas para os sistemas em fluxo propostos, neste método foram utilizados apenas 20,0  $\mu\text{L}$  de solução de amostra e reagente, portanto, a quantidade de resíduo gerado também é negligenciável. Desta forma, os métodos analíticos proposto neste trabalho são método ambientalmente amigáveis, uma vez que atendem plenamente os princípios da Química Verde.



## 10 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante do exposto, futuramente, poderá ser estudada a aplicação de métodos alternativos de análise em fluxo, especialmente empregando multi-bombas, por detectar níveis traços, para o controle e monitoramento do principal metabólito do glifosato (AMPA) com reagente mais seletivo, já que existe polêmica quanto aos seus efeitos no organismo humano e no ambiente.

Além disso, poderá ser verificada a viabilidade de aplicação do sistema em fluxo com multi-bombas para o controle e monitoramento de herbicidas que apresentam risco à saúde dos agricultores em matrizes ambientais como solos e lixiviados, por exemplo.

Outro aspecto importante que poderá ser estudado é o surfactante, substância presente em formulações comerciais. Esta é adicionada no produto comercial porque promove melhor aderência e, conseqüentemente maior tempo de exposição do glifosato na planta. Embora os herbicidas apresentem grande eficiência de aplicação, a elevada concentração deste composto nas formulações comerciais torna o produto comercial mais tóxico, segundo alguns pesquisadores<sup>20</sup>, do que o próprio glifosato e o seu metabólito (AMPA).

## REFERÊNCIAS

- 1 BAIRD, C. Produtos orgânicos tóxicos. In: \_\_\_\_\_. **Química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 313-395.
- 2 MANLY, R. Biological indicators. In: FIFIELD, F. W.; HAINES, P. J. **Environmental analytical chemistry**. 5th ed. London: Blackie Academic and Professional, 1995. p. 268-272.
- 3 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.
- 4 JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.
- 5 DOMINGUES, M. R. et al. Agrotóxicos: risco à saúde do trabalhador rural. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 45-54, 2004.
- 6 BENATTO, A. Agrotóxicos, transgênicos e outros contaminantes. **Gazeta do Povo e os Alimentos Orgânicos**, 2011. Disponível em: <<http://emdefesadacomida.blogspot.com/2011/03/mais-de-um-bilhao-de-litros-de.html>>. Acesso em: 19 set. 2011.
- 7 SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, 2006. Disponível em: <[http://www.fmr.edu.br/npi\\_2.php.9p](http://www.fmr.edu.br/npi_2.php.9p)>. Acesso em: 07 out. 2011.
- 8 REBELO, R. M. et al. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Brasília, DF: IBAMA, 2010. 84 p.
- 9 GONÇALVES, A. H. et al. Subdoses de sulfosate sobre a inibição da atividade da EPSPs em plantas de milho. **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 465-470, 2002.
- 10 BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Amino acids. In: \_\_\_\_\_. **Biochemistry & molecular biology of plants**. 2nd ed. Rockville: American Society of Plants Physiologists, 2000. p. 382.
- 11 ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume. 2002. p. 23-29.
- 12 AQUINO NETO, S. **Degradação do herbicida glifosato e suas formulações comerciais: uma comparação entre processos eletrolíticos**. 2000. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.
- 13 BELLOTTI, A. C.; CADONA, C.; LAPIONTE, S. L. Trends in pesticide use in Colômbia and Brazil. **Journal of Agricultural Entomology**, v. 7, n. 3, p. 191-201, 1990.

- 14 CHAGAS, I. D. **Os impactos dos agroquímicos sobre o meio ambiente**. 2009. Disponível em: <<http://www.webartigos.com/artigos/os-impactos-dos-agroquimicos-sobre-o-meio-ambiente/34298/>>. Acesso em: 21 set. 2011.
- 15 PERES, F.; MOREIRA, J. C.; LUZ, C. Os impactos dos agrotóxicos sobre a saúde e o ambiente. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 4, 2007.
- 16 INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Defensivos agrícolas: desempenho recorde em 2010 e expectativas de aumento nas vendas em 2011**. 2011. Disponível em: <[www.iea.sp.gov.br/out/Lertexto.php?codTexto=12192](http://www.iea.sp.gov.br/out/Lertexto.php?codTexto=12192)>. Acesso em: 31 out. 2011.
- 17 AMÉRICO, J. **Mercado dos agrotóxicos, legislação e irregularidades**. 2011. Disponível em: <[www.radioagencianp.com.br/9571-Mercado-dos-agrotoxicos-legislacao-e-irregularidades](http://www.radioagencianp.com.br/9571-Mercado-dos-agrotoxicos-legislacao-e-irregularidades)>. Acesso em: 24 ago. 2011.
- 18 SANTOS, I. F. **Os incontáveis perigos dos agrotóxicos no campo**. 2010. Disponível em: <<http://www.chacaradeorganicos.com.br/tag/programa-de-analise-de-residuos-de-agrotoxicos-e-alimentos/>>. Acesso em: 26 set. 2011.
- 19 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.
- 20 AMARANTE JÚNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- 21 DILL, G. M.; CAJACOB, C. A.; PADGETTE, S. R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 326-331, 2008.
- 22 O'NEIL, M. J. (Ed.). **The merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. New Jersey: Merck, 2001. p. 779.
- 23 VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, 2009.
- 24 ROUNDUP ® Monsanto. **Agenda Sustentável**. [2009]. Disponível em: <[www.agendasustentavel.com.br/images/pdf/002433.pdf](http://www.agendasustentavel.com.br/images/pdf/002433.pdf)>. Acesso em: 26 set. 2011.
- 25 SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. **Glifosato alavanca venda de defensivo genérico no Brasil**. 2010. Disponível em: <[http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2070](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2070)>. Acesso em: 28 set. 2011.
- 26 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Época de aplicação dos herbicidas**. 2006. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do62\\_11.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do62_11.htm)>. Acesso em: 29 set. 2011.

- 27 VIANA, R. S. **Aplicação de maturadores químicos no final de safra, associada à eliminação de soqueira em área de reforma do canavial**. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- 28 MAIA, J. D. G. **Cultivo da videira niágara rosada em regiões tropicais do Brasil: manejo de plantas daninhas**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaNiagaraRosadaRegioesTropicais/index.htm>>. Acesso em: 29 set. 2011.
- 29 WILLIAMS, G. M.; KROES, R. M.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.
- 30 FLAMENGO, C. **Diversidade das plantas**. 2011. Disponível em: <[http://diversidadedasplantas.blogspot.com.br/2011\\_05\\_01\\_archive.html](http://diversidadedasplantas.blogspot.com.br/2011_05_01_archive.html)>. Acesso em: 30 out. 2011.
- 31 WEB SITE SAÚDE. **Vantagens e desvantagens dos alimentos transgênicos**. 2001. Disponível em: <<http://www.websitesaude.kit.net/transgenicos.htm>>. Acesso em: 30 out. 2011.
- 32 MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, v. 64, n. 4, p. 517-531, 2005.
- 33 GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M. A. et al. Glyphosate immunosensor. Application for water and soil analysis. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 13, p. 4219-4227, 2005.
- 34 STRUGER, J. et al. Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ontario. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, n. 4, p. 378-384, 2008.
- 35 COUTINHO, C. F. B. et al. Rapid and direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water using anion-exchange chromatography with coulometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1-2, p. 246-249, 2008.
- 36 SUBRAMANIAM, V.; HOGGARD, P. E. Metal complexes of glyphosate. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1326-1329, 1988.
- 37 ABREU, A. B. G. ; MATTA, M. H. R. ; MONTAGNER, É. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 5-9, 2008.
- 38 BHASKARA, B. L.; NAGARAJA, P. Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples. **Helvetica Chimica Acta**, v. 89, n. 11, p. 2686-2693, 2006.
- 39 SOUZA, T. A. et al. Estudo de recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1372-1376, 2006.

- 40 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.
- 41 CHIU, H-Y. et al. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, n. 1, p. 195-198, 2008.
- 42 YOU, J.; KALJURAND, M.; KOROPCHAK, J. A. Direct determination of glyphosate in environmental waters using capillary electrophoresis with electrospray condensation nucleation light scattering detection. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 83, n. 9, p. 797-806, 2003.
- 43 XIAO, J. et al. Determination of glyphosate in water samples by alternating-current oscillopolarographic titration. **Analytical Sciences**, v. 20, n. 10, p. 1415-1418, 2004.
- 44 KATAOKA, H. et al. Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 726, n. 1-2, p. 253-258, 1996.
- 45 ALFERNESS, P. L.; IWATA, Y. Determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gas chromatography with mass-detection. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2751-2759, 1994.
- 46 ROYER, A. et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. Application on vegetable matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 16, p. 3826-3832, 2000.
- 47 HU, J-Y. ; CHEN, C-L. ; LI, J-Z. A simple method for the determination of glyphosate residues in soil by capillary gas chromatography with nitrogen phosphorus. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 371-375, 2008.
- 48 STALIKAS, C. D.; PILIDIS, G. A.; KARAYANNIS, M. I. An integrated gas chromatographic method towards the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides. **Chromatographia**, v. 51, n. 11/12, p. 741-746, 2000.
- 49 STALIKAS, C. D.; PILIDIS, G. A. Development of a method for the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides by gas chromatography with mass-selective detection: optimization of the derivatization procedure using an experimental design approach. **Journal of Chromatography A**, v. 872, n. 1-2, p. 215-225, 2000.
- 50 MARQUES, M. N. **Cromatografia de íons aplicada na especificação de crômio hexavalente em amostras de interesse ambiental**. 1999. 63 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Materiais Nucleares) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

- 51 ZHU, Y. et al. Determination of glyphosate by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 850, n. 1-2, p. 297-301, 1999.
- 52 SANCHEZ, J. M.; GRETTEY, E.; RIVAS, Z. Determination of glifosate in water samples in the Catatumbo river basin. **Ciência**, v. 13, n. 2, p. 211-217, 2005.
- 53 ZHANG, P. et al. Determination of glyphosate in soil by ion chromatography. **Fenxi Ceshi Xuebao**, v. 22, n. 4, p. 89-90, 2003.
- 54 ZHANG, X.; WU, M. Determination of glyphosate in drinking water by ion chromatography coupled with suppressed conductance. **Guangdong Huagong**, v. 37, n. 6, p. 206-207, 2010.
- 55 MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography–post-column derivatization with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n. 1-2, p. 129-136, 1998.
- 56 MARQUES, M. N. P. et al. Determination of glyphosate in water samples by IC. **Journal Chromatographic Science**, v. 47, n. 9, p. 822-824, 2009.
- 57 HIDALGO, C. et al. 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.
- 58 MORLIER, L. W.; TOMKINS, D. F. Liquid chromatographic determination of glyphosate in water-soluble granular formulations: collaborative study. **Agricultural Materials**, v. 80, n. 3, p. 1-9, 1996.
- 59 COLIN, R. et al. Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid (AMPA) in water by liquid chromatography and fluorescence detection. Part II: Direct determination using pre-column derivatization with NBD-Cl. **Analisis**, v. 28, n. 9, p. 819-824, 2000.
- 60 HANKE, I.; SINGER, H.; HOLLENDER, J. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 6, p. 2265-2276, 2008.
- 61 IBÁÑEZ, M. et al. Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1-2, p. 51-55, 2006.

- 62 LE FUR, E. et al. Determination of glyphosate herbicide and aminomethylphosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pré-column fluorogenic labeling. Part I: direct determination at the  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , level using FMOC. **Analisis**, v. 28, n. 9, p. 813-818, 2000.
- 63 NEDELKOSKA, T. V.; LOW, G. K. C. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, n. 1, p. 145-153, 2004.
- 64 PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 1, p. 61-66, 2008.
- 65 ABDULLAH, M. P. et al. Improved method for the determination of glyphosate in water. **Journal of Chromatography A**, v. 697, n. 1-2, p. 363-369, 1995.
- 66 QIAN, K. et al. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 2, p. 222-226, 2009.
- 67 VREEKEN, R. J. et al. Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 794, n. 1-2, p. 187-199, 1998.
- 68 LE BOT, B. et al. Optimization and performance evaluation of the analysis of glyphosate and AMPA in water by HPLC with fluorescence detection. **Chromatographia**, v. 56, n. 3-4, p. 161-164, 2002.
- 69 HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. Jr. **Official methods of analyses of AOAC international**. Gaithersourg: AOAC International, 2005. p. 60-100.
- 70 RUBIO, F. et al. Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for glyphosate determinations in water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 691-696, 2002.
- 71 RIDLEN, J. S.; KLOPF, G. J.; NIEMAN, T. A. Determination of glyphosate and related compounds using HPLC with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) electrogenerated chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 341, n. 2-3, p. 195-204, 1997.
- 72 LEE, E. A. et al. Linker-assisted immunoassay and liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of glyphosate. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 19, p. 4937-4943, 2002.
- 73 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.

- 74 ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.
- 75 JAN, M. R. et al. Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1-3, p. 742-745, 2009.
- 76 WEST, R. Siegfried Ruhemann and the discovery of ninhydrin. **Journal of Chemical Education**, v. 42, n. 7, p. 386-387, 1965.
- 77 TEÓFILO, R. F. et al. Glyphosate determination in soil, water and vegetables using DPV optimized by response surface methodology. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 26, n. 4, p. 325-337, 2008.
- 78 COLOMBO, S. de M.; MASINI, J. C. Developing a fluorimetric sequential injection methodology to study adsorption/desorption of glyphosate on soil and sediment samples. **Microchemical Journal**, v. 98, n. 2, p. 260-266, 2011.
- 79 RAFIEI KESHITELI, M.; FARAHBAKHAH, M.; SAVAGHEBI, G. R. Adsorption behavior of glyphosate in some citrus garden soils of Iran. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 1943-1951, 2011.
- 80 ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F. Determinação de glifosato e AMPA em maçã empregando extração em fase sólida (SPE) e CLAE: comparação entre os dois métodos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, Águas de Lindóia. **Anais ... São Paulo: SBQ**, 2008.
- 81 YAMAKI, M. B. et al. Occurrence of antibiotic in milk from Manchega ewe dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3132-3137, 2004.
- 82 VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M. Sample screening systems in analytical chemistry. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 685-694, 1999.
- 83 TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F.X. Validation of qualitative analytical methods. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137-145, 2004.
- 84 IDRIS, A. M. Screening of conditions controlling spectrophotometric sequential injection analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2011.
- 85 KENYON, A. S.; FLINN, P. E.; LAYLOFF, T. P. Rapid screening of pharmaceuticals by thin layer chromatography: analysis of essential drugs by visual methods. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 1, p. 41-49, 1995.
- 86 YIBAR, A.; CETINKAYA, F.; SOYUTEMIZ, G. E. ELISA screening and liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmation of chloramphenicol residues in chicken muscle, and the validation of a confirmatory method by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Poultry Science**, v. 90, n. 11, p. 2619-2626, 2011.



- 87 ANASTAS, P. T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167-175, 1999.
- 88 LENARDÃO, E. J. et al. Green chemistry: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.
- 89 PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.
- 90 GHAUCH, A. et al. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu(II) by diffuse reflectance spectrometry. **Talanta**, v. 48, n. 2, p. 385-392, 1999.
- 91 GHAUCH, A. et al. Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1327-1333, 2000.
- 92 TUBINO, M.; QUEIROZ, C. A. R. Flow injection visible diffuse reflectance quantitative analysis of nickel. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, n. 1-2, p. 199-204, 2007.
- 93 VOGEL, A. I. Espectroscopia eletrônica molecular. In: \_\_\_\_\_. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. p. 351-385.
- 94 TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe(III), Cr (VI) and Ni (II) by reflectance measurements. **Analytical Letters**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 1997.
- 95 GOTARDO, M. A. et al. Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 361-365, 2004.
- 96 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 2007. p. 118-356.
- 97 CAZAR, R. A. An exercise on chemometrics for a quantitative analysis course. **Journal of Chemical Education**, v. 80, n. 9, p. 1026-1029, 2003.
- 98 MILLER, J. C.; MILLER, J. M. **Statistics for analytical chemistry**. 2nd. ed. London: Ellis Horwood, 1992.
- 99 LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. p. 9-28.
- 100 RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- 101 LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A, 1983.

- 102 MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.
- 103 ZAWILLA, N. H. Determination of aceclofenac in bulk and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, n. 1-2, p. 243-251, 2002.
- 104 SAEED, A.; HAQUE, S.; QURESH, S. Z. Resin bead detection and spectrophotometric determination of oxyphenbutazone with *p*-dimethylaminocinnamaldehyde: Application to bulk drug and dosage forms. **Talanta**, v. 40, n. 12, p. 1867-1871, 1993.
- 105 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 276-299.
- 106 RUFINO, J. L.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Flow-injection spectrophotometric determination of azithromycin in pharmaceutical formulations using *p*-chloranil in the presence of hydrogen peroxide. **Analytical Science**, v. 24, n. 7, p. 871-876, 2008.
- 107 BARBOSA, A. C. R. N. et al. Aquecimento em forno de micro-ondas. Desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 901-904, 2001.
- 108 RIBEIRO, P. R. S.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of methyl dopa in pharmaceutical formulations by combined spot test-diffuse reflectance spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 4, p. 674-679, 2006.
- 109 RUZICKA, J. Flow injection-renewable surface techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 308, n. 1-3, p. 14-19, 1995.
- 110 REIS, B. F.; GUINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. Continuous flow injection chemical analysis. **Química Nova**, v. 12, n. 1, p. 82-91, 1989.
- 111 LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. et al. Development of an automated chemiluminescence flow-through sensor for the determination of 5-aminosalicylic acid in pharmaceuticals: a comparative study between sequential and multicommutated flow techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 3, p. 845-853, 2009.
- 112 ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 119-125, 2000.
- 113 LIMA, J. F. C. et al. Multi-pumping flow system: an automation tool. **Talanta**, v. 64, n. 5, p. 1091-1098, 2004.
- 114 MATOS, R. C. et al. Propulsor pneumático versátil e isento de pulsação para sistemas de análise em fluxo. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 795-798, 2001.
- 115 REIS, B. F. et al. Multicommutation in flow analysis I. Binary sampling- concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293, n. 1-2, p. 129-138, 1994.

116 CERDÀ, V.; FORTEZA, R.; ESTELA, J. M. Potential of multisyringe flow-based multicommutated systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, n. 1-2, p. 35-45, 2007.

117 DIAS, A. C. B. et al. A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 5-6, p. 1303-1310, 2007.

118 REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51-58, 1996.

119 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Spectrophotometric determination of glyphosate as its N-nitroso derivative. Disponível em: <[www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/d+e/d\\_glypho.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/d+e/d_glypho.pdf)>. Acesso em: 18 mar. 2011.

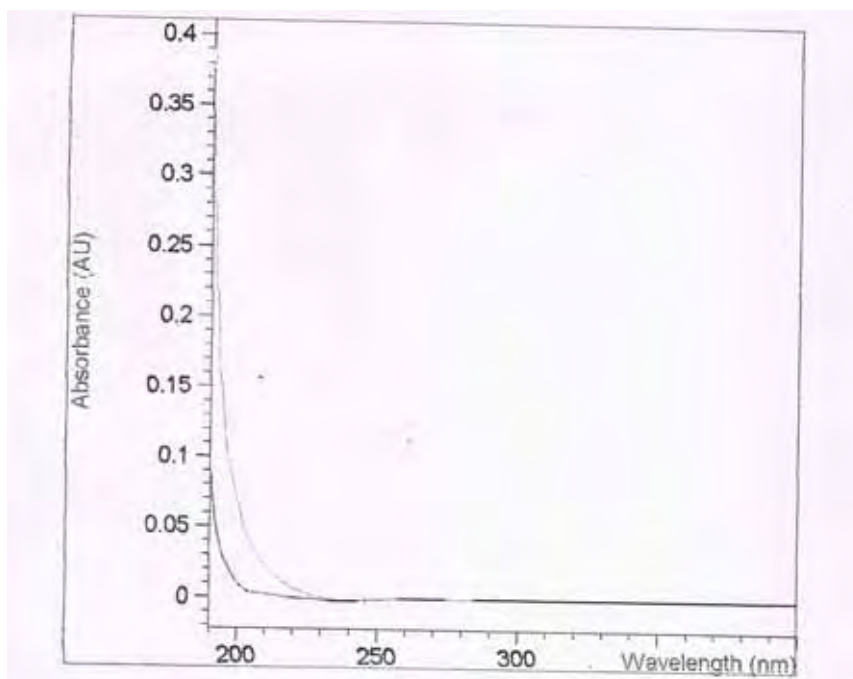
120 ZAGATTO, E. A. G. et al. An improved flow injection determination of nitrite in waters by using intermittent flows. **Analytica Chimica Acta**, v. 120, p. 399-403, 1980.

121 SANTOS, J. L. M. et al. Multi-pumping flow system: the potential of simplicity. **Analytical Chimica Acta**, v. 600, n. 1-2, p. 21-28, 2007.

122 SANTOS, J. L. M. et al. Multipumping flow systems: an alternative approach to sample handling in spectroscopy measurements. **Spectroscopy Letters**, v. 40, n. 1, p. 41-50, 2007.

## ANEXOS

## 1 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO GLIFOSATO



**Figura 69.** Espectro de absorção do glifosato na região do UV-Vis, nas concentrações de 10,0 mg L<sup>-1</sup> e 50,0 mg L<sup>-1</sup>.

## 2 – PROPRIEDADES QUÍMICAS DO GLIFOSATO

Glifosato é o nome comum para o isômero principal do N-(fosfometil) glicina ( $C_6H_{17}N_2O_5P$ ). O produto é um sólido (pó úmido branco) apresentando-se com grau de pureza de 75 %, quando seco. Sua solubilidade em água é de aproximadamente  $12 \text{ g L}^{-1}$ . Sua volatilidade é de  $2,08 \times 10^{-12} \text{ atm mol}^{-1}$ . Nessa linha, a pressão de vapor é de  $1,95 \times 10^{-7} \text{ mm Hg}$ .

Os valores de sorção mostram uma forte adsorção do glifosato, apesar da sua alta solubilidade hidrolítica, Kd variando entre 62 a 175. Deve-se considerar que o glifosato é um composto orgânico dipolar que possui alta adsorção aos óxidos de alumínio de ferro. Devido à sua alta adsorção, os testes de mobilidade indicam baixa mobilidade, em placa, com RF variando de 0 a  $0,5^{23}$ .

Quanto à degradação:

- Hidrólise – estável,
- Fotólise - > 100 dias e
- Biodegradação – variável entre 1 e 174 dias, média de 47 dias.

Os estudos de Bioconcentração mostraram  $\log K_{ow} -3,2$  que o dispensa do estudo em organismos vivos. Mesmo assim, isso foi realizado e mostrou um  $BCF = 0,52$  para peixe.

## 3 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE DUAS AMOSTRAS DE ÁGUA

**3.1 Amostra: Água do Ribeirão dos Porcos – S: 21°26'705; WO: 48°30'956; A: 505m**

**RESULTADOS PARA FINS DE ORIENTAÇÃO**

PARÂMETROS	CONCENTRAÇÃO	VMP CONAMA 357 (mg L <sup>-1</sup> )
Óleos e graxas (mg L <sup>-1</sup> )	VA	VA
Cor (mg Pt L <sup>-1</sup> )	14,00	75
Turbidez (UNT)	6,00	100
DBO <sub>5</sub> (20°C) (mg L <sup>-1</sup> de O <sub>2</sub> )	7,80	5
Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	7,20	5
pH	7,55	6,0 a 9,0
Alumínio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,1
Nitrogênio amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )	<0,50	3,70
Arsênio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01	0,01
Bário total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,7
Berílio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,04	0,04
Boro total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,5
Benzeno (mg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,005
Benzo-a-pireno (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,05
Cádmio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,001
Cianeto livre (mg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,005
Chumbo total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01	0,01
Cloreto total (mg L <sup>-1</sup> )	2,50	250
Cloro residual total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01	0,01
Cobalto total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,05
Cobre dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	<0,009	0,009
Crômio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,05
1,1-dicloroetano (mg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,003
1,2-dicloroetano (mg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,01
Fenóis (índices) (mg L <sup>-1</sup> )	<0,003	0,003
Ferro dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0,55	0,3
Fluoreto total (mg L <sup>-1</sup> )	0,11	1,4
Fósforo total (ambiente lótico) (mg L <sup>-1</sup> )	<0,10	0,1
Lítio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	2,5
Manganês total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,1
Mercúrio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,0002	0,0002
Níquel total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,025	0,025
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	0,15	10
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	<0,005	1,0
Prata total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01	0,01
Pentaclorofenol (µg L <sup>-1</sup> )	<0,002	0,009
Selênio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01	0,01

Sólidos totais dissolvidos (mg L <sup>-1</sup> )	57,53	500
Substâncias tensoativas (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,5
Sulfato total (mg L <sup>-1</sup> )	<1,00	250
Sulfeto total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,002	0,002
Tetracloroeteno (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,01
Tricloroeteno (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,03
Tetracloroeto de carbono (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,002
2,4,6-triclorofenol	<0,002	0,01
Urânio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,02	0,02
Vanádio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,1
Zinco total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,18
Aldrin + Dieldrin (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,005
Clordano (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,04
DDT (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,002
Endrin (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,004
Endossulfan (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,056
Epóxido de heptacloro + heptacloro (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,01
Lindano (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,02
Metóxicloro (µg L <sup>-1</sup> )	<0,002	0,03
Dodecacloro pentaciclodecano (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,01
PCB's (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,001
Toxafeno (µg L <sup>-1</sup> )	<0,002	0,01
Demeton (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,1
Gution (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,005
Malation (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,1
Paration (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,04
Carbaril (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,02
Organofosforados e carbamatos totais (µg L <sup>-1</sup> )	<0,002	10
2,4-D (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	4
2,4,5-TP (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	10,0
2,4,5-T (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	2,0

## Notas:

- (VMP) Valor máximo permitido pela Resolução CONAMA 357 de 17 de Março de 2005 para águas doces de classe 2  
 - Os metais foram determinados por Espectrometria de Emissão Atômica – ICP-OES ou Espectrometria de Absorção Atômica – EAA, de acordo com metodologias recomendadas pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater – 20ª Edição. - PAHs: EPA, Método 610, validado p/ método 8100 - Carbamatos - Método EPA 8321A- HPLC; 2,4D - Método EPA 8321A/ 2,4T- 8321A / Clorados- 8020 , 8082 / Acrilamida 8032 - BTEX: EPA Test methods for evaluating solid waste - v. 1B - Laboratory Manual Physical/Chemical Methods. Métodos 3810, 8020.

- **Conclusão:** De acordo com os parâmetros determinados e listados neste resultado analítico, trata-se de água que atende os padrões de qualidade estabelecidos pela Resolução CONAMA 357 de 17 de Março de 2005 para águas doces de classe 2.

Araraquara, 20 de Julho de 2007.

### 3.2 Amostra: Água da Represa Fucci – S: 21°24'788; WO: 48°30'851; A: 523m

#### RESULTADOS PARA FINS DE ORIENTAÇÃO

PARÂMETROS	CONCENTRAÇÃO	CONAMA 357 (mg L <sup>-1</sup> )
Óleos e graxas (mg L <sup>-1</sup> )	VA	VA
Cor (mg Pt L <sup>-1</sup> )	41,00	75
Turbidez (UNT)	3,00	100
DBO <sub>5</sub> (20°C) (mg L <sup>-1</sup> de O <sub>2</sub> )	6,00	5
Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	7,20	5
pH	7,21	6,0 a 9,0
Alumínio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	<0,10	0,1
Nitrogênio amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )	<0,50	3,70
Arsênio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01	0,01
Bário total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,7
Berílio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,04	0,04
Boro total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,5
Benzeno (mg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,005
Benzo-a-pireno (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,05
Cádmio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,001
Cianeto livre (mg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,005
Chumbo total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01	0,01
Cloreto total (mg L <sup>-1</sup> )	1,40	250
Cloro residual total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01	0,01
Cobalto total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,05
Cobre dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	<0,009	0,009
Crômio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,05
1,1-dicloroetano (mg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,003
1,2-dicloroetano (mg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,01
Fenóis (índices) (mg L <sup>-1</sup> )	<0,003	0,003
Ferro dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0,59	0,3
Fluoreto total (mg L <sup>-1</sup> )	0,11	1,4
Fósforo total (ambiente lóxico) (mg L <sup>-1</sup> )	<0,10	0,1
Lítio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	2,5
Manganês total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,1
Mercúrio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,0002	0,0002
Níquel total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,025	0,025
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	0,09	10
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	<0,005	1,0
Prata total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01	0,01
Pentaclorofenol (µg L <sup>-1</sup> )	<0,002	0,009
Selênio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01	0,01



Sólidos totais dissolvidos (mg L <sup>-1</sup> )	37,80	500
Substâncias tensoativas (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,5
Sulfato total (mg L <sup>-1</sup> )	<1,00	250
Sulfeto total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,002	0,002
Tetracloroeteno (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,01
Tricloroeteno (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,03
Tetracloroeto de carbono (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,002
2,4,6-triclorofenol	<0,002	0,01
Urânio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,02	0,02
Vanádio total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,1
Zinco total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05	0,18
Aldrin + Dieldrin (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,005
Clordano (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,04
DDT (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,002
Endrin (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,004
Endossulfan (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,056
Epóxido de heptacloro + heptacloro (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,01
Lindano (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,02
Metóxicloro (µg L <sup>-1</sup> )	<0,002	0,03
Dodecacloro pentaciclodecano (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,01
PCB's (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,001
Toxafeno (µg L <sup>-1</sup> )	<0,002	0,01
Demeton (µg L <sup>-1</sup> )	<0,001	0,1
Gution (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,005
Malation (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,1
Paration (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,04
Carbaril (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	0,02
Organofosforados e carbamatos totais (µg L <sup>-1</sup> )	<0,002	10
2,4-D (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	4
2,4,5-TP (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	10,0
2,4,5-T (µg L <sup>-1</sup> )	<0,005	2,0

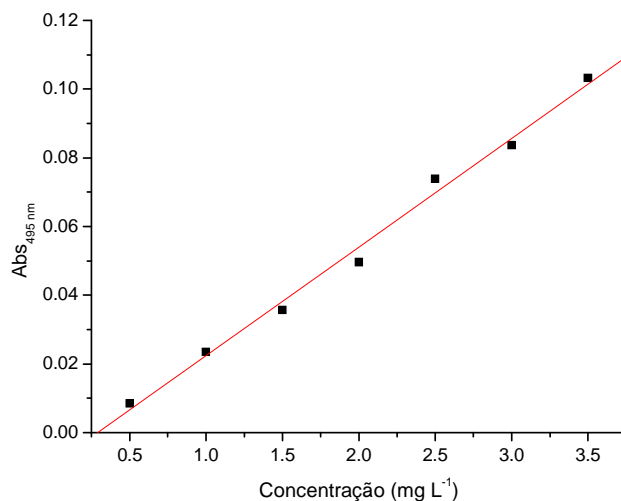
## Notas:

- (VMP) Valor máximo permitido pela Resolução CONAMA 357 de 17 de Março de 2005 para águas doces de classe 2  
 - Os metais foram determinados por Espectrometria de Emissão Atômica – ICP-OES ou Espectrometria de Absorção Atômica – EAA, de acordo com metodologias recomendadas pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater – 20ª Edição. - PAHs: EPA, Método 610, validado p/ método 8100 - Carbamatos - Método EPA 8321A- HPLC; 2,4D - Método EPA 8321A/ 2,4T- 8321A / Clorados- 8020 , 8082 / Acrilamida 8032 - BTEX: EPA Test methods for evaluating solid waste - v. 1B - Laboratory Manual Physical/Chemical Methods. Métodos 3810, 8020.

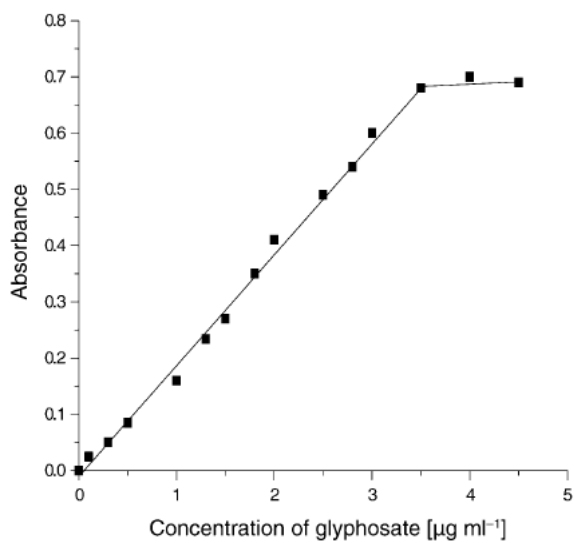
- **Conclusão:** De acordo com os parâmetros determinados e listados neste resultado analítico, trata-se de água que atende os padrões de qualidade estabelecidos pela Resolução CONAMA 357 de 17 de Março de 2005 para águas doces de classe 2.

Araraquara, 20 de Julho de 2007.

#### 4 – CURVA ANALÍTICA OBTIDA COM A REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO E NINIDRINA, NA PRESENÇA DE MOLIBDATO DE SÓDIO



**Figura 70.** Curva analítica obtida experimentalmente, na aplicação do método comparativo, conforme descrito na literatura<sup>38</sup>



**Figura 71.** Curva analítica do método comparativo obtida pelos pesquisadores Bhaskara e Nagaraja.

**Fonte:** Bhaskara e Nagaraja<sup>38</sup>