UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

ERICO APARECIDO OLIVEIRA PEREIRA

**Determinação de glifosato e ácido
aminometilfosfônico em amostras ambientais
por cromatografia a líquido em fase reversa
controlada por injeção sequencial**

Versão Corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

28/06/2018

ERICO APARECIDO OLIVEIRA PEREIRA

**Determinação de glifosato e ácido
aminometilfosfônico em amostras ambientais por
cromatografia a líquido em fase reserva controlada
por injeção sequencial**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Química*

Orientador: Prof. Dr. Jorge Cesar Masini

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P436d Pereira, Erico Aparecido Oliveira
 Determinação de glifosato e ácido
 aminometilfosfônico em amostras ambientais por
 cromatografia a líquido em fase reversa controlada
 por injeção sequencial / Erico Aparecido Oliveira
 Pereira. - São Paulo, 2018.
 98 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
Orientador: Masini, Jorge Cesar

1. Glifosato. 2. SIC. 3. Colunas Monolíticas. 4.
Adsorção. 5. Solo. I. T. II. Masini, Jorge Cesar,
orientador.

Dedicado aos meus pais, José e Maria, por todo amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores que tive ao longo de minha formação. Sem a ajuda destes profissionais incríveis, não teria chegado aqui.

Em especial, ao Prof. Dr. Jorge Cesar Masini por me acolher tão bem em seu grupo, pela paciência, amizade, ajuda e motivação durante o desenvolvimento do projeto. Sou profundamente grato.

Aos professores Dr. Lúcio Angnes, Dr. Thiago R. L. C. da Paixão e Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira pelas sugestões e reflexões ao longo do exame de qualificação.

À Profa. Dra. Silvia H. P. Serrano pelos ensinamentos durante o estágio como monitor e o curso de sensores.

À Dra. Marilda Rigobello-Masini pelas conversas de alto nível sobre diversos assuntos que tivemos ao longo dos últimos dois anos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pelas inúmeras dúvidas sanadas.

Aos colegas de laboratório e amigos da pós-graduação: Advinia, Camila, Leandro, Luís Fernando, Maurício, Samara e Thalita.

Aos meus amigos de longa data: Adriano, Allan, Amanda, Bruno “Bitelo”, Caroline, Igor “Japonês”, Gilliard, Lennon, Sullivan e Tiago.

Aos amigos da graduação: Bruno, Camila Yukie, Cecília, Felipe “Alemão” e Igor “Rímel”.

À Laurel Bingman por todo o carinho e incentivo.

Aos meus pais, José e Maria, meus irmãos, Jéssica e Edwy, tios, primos e avós pelo apoio incondicional e palavras de encorajamento.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the Universe exist. Be curious.”

Stephen Hawking

RESUMO

Pereira, E. A. O. **Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em amostras ambientais por cromatografia a líquido em fase reversa controlada por injeção sequencial**. 2018. 98 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Introduzido na década de 1970, o glifosato figura entre os herbicidas mais consumidos em todo mundo. Devido a características como baixa toxicidade aguda a organismos não-alvo e alta eficiência na eliminação de plantas daninhas, o herbicida se tornou um sucesso de vendas, com um substancial incremento em sua utilização após o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas para tolerar o ingrediente ativo. O elevado consumo do glifosato vem se tornando uma preocupação para diferentes agências ambientais e de saúde. Consequentemente, métodos eficientes para a determinação e quantificação do herbicida se fazem necessários. Na presente dissertação, aprimorou-se um método que utiliza um sistema de análise de injeção sequencial por cromatografia líquida (SIC) com detecção por fluorescência para a determinação de glifosato e seu principal produto de degradação, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), em amostras ambientais. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o glifosato foram 0,10 e 0,33 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Já para o AMPA, LD foi de 0,07 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LQ de 0,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método foi empregado na determinação das espécies em amostras de água fortificadas e gerou valores de recuperação entre 97,2 a 151,5% para o AMPA e 74,6 a 140,5% para o glifosato. Quando empregado em um estudo de adsorção-dessorção, o método foi capaz de produzir valores dos parâmetros de Freundlich e Langmuir comparáveis aos encontrados na literatura. Com $q_{\text{max}} = 2,1 \pm 0,1 \mu\text{mol g}^{-1}$ e $K_F = 0,53 \pm 0,07 \mu\text{mol}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{g}^{-1}$, o Latossolo B se mostrou como o solo com maior capacidade de adsorver o glifosato. Em termos de dessorção, o percentual dessorvido ficou abaixo de 55% da quantidade inicialmente adsorvida para as concentrações trabalhadas.

Palavras-chave: glifosato, AMPA, SIC, colunas monolíticas, adsorção, solo.

ABSTRACT

Pereira, E. A. O. **Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental samples by reversed-phase liquid chromatography controlled by sequential injection.** 2018. 98 p. Master's Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Introduced in the 1970, glyphosate figures among the most used herbicides in the world. Due to characteristics such as low acute toxicity to non-target organisms and high efficiency regarding the elimination of weeds, the herbicide has experienced a huge success in terms of sales. Since genetically modified crops that tolerate the active ingredient have been developed, these sales have continued to increase. Glyphosate's high consumption has become a concern to different environmental and health agencies. As a result, efficient methods for the determination of glyphosate and its main metabolite, aminomethylphosphonic acid (AMPA), are necessary. This dissertation describes improvements in a sequential injection chromatography method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental samples. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for glyphosate is 0.10 e 0.33 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. LOD of 0.07 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and LOQ of 0,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ is registered for AMPA. The method was employed for the determination of both species in spiked water samples and recovery values between 97.2 a 151.5% was obtained for AMPA and between 74.6 a 140.5% for glyphosate. When used in an adsorption-desorption study, the method was capable of generating values for the Freundlich and Langmuir parameters that are similar to those found in the scientific literature. With a q_{max} of $2.1 \pm 0.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ and $K_F = 0.53 \pm 0.07 \mu\text{mol}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{g}^{-1}$, Latossolo B was the soil sample with the largest glyphosate adsorption capacity. Regarding desorption, the percentages desorbed were below 55% of the initial mass of glyphosate adsorbed for the concentrations used.

Keywords: glyphosate, AMPA, SIC, monolithic columns, adsorption, soil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA: Ácido aminometilfosfônico (do inglês *Aminomethylphosphonic Acid*)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CIO⁻: Hipoclorito

CTC: Capacidade de Troca Catiônica

DPR: Desvio Padrão Relativo

GLY: Glicina (do inglês *Glycine*)

GLYPH: Glifosato (do inglês *Glyphosate*)

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

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

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ME: 2-Mercaptoetanol

OPA: o-ftaldialdeído (do inglês *o-phthalaldehyde*)

R.F.U.: Unidades Relativa de Fluorescente (do inglês *Relative Fluorescence Units*)

S_d: Desvio Padrão (do inglês *Standard Deviation*)

SIA: Análise por injeção sequencial (do inglês *Sequential Injection Analysis*)

SIC: Cromatografia por injeção sequencial (do inglês *Sequential Injection Chromatography*)

TOC: Carbono Orgânico (do inglês *Total Organic Carbon*)

US EPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês *United States Environmental Protection Agency*)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Dissociação do glifosato.....	24
Figura 2: Possíveis mecanismos para a sorção do GLYPH em óxidos de ferro. A) formação de complexo mononuclear e monodentado. B) formação de complexo binuclear e bidentando. C) formação de complexo mononuclear e monodentado a partir de complexo binuclear e bidentado. Adaptado de (Borggaard & Gimsing, 2008)	27
Figura 3: Sorção de GLYPH e fosfato inorgânico. A) Competição entre GLYPH e fosfato inorgânico. B) Sorção em dois planos. Fonte: (Borggaard & Gimsing, 2008).....	29
Figura 4: Degradação microbiana do GLYPH pelas rotas da Sarcosina e AMPA.....	30
Figura 5: Típico sistema SIA. SP = solução transportadora, BP = bomba peristáltica, BC = bobina coletora, BR = bobina reacional, D = detector, VR = válvula rotatória (ou seletora), W = descarte, R1 = reagente 1, A = amostra, R2 = reagente 2	37
Figura 6: Típico sistema SIC. W = descarte, D = detector, CM = coluna monolítica, PC = pré-coluna, R1 = reagente 1, R2 = reagente 2, A = amostra, VR = válvula rotatória (ou seletora), BC = bobina coletora, VA = válvula de alívio, BS = bomba de seringa, FM = fase móvel	41
Figura 7: Configuração do sistema SIC utilizado para a separação cromatográfica do AMPA e GLYPH. FM ₁ = Fase Móvel 1 (15 : 85 MeOH : tampão fosfato 10 mmol L ⁻¹ , pH 6,8); FM ₂ = Fase Móvel 2 (50 : 50 MeOH : tampão fosfato 10 mmol L ⁻¹ , pH 6,8), BS = bomba de seringa (capacidade de 4 mL), VA = válvula de alívio, BC = bobina coletora, VR = válvula rotatória com (5000 psi), OPA-ME = 150 mg L ⁻¹ em tampão borato 50 mmol L ⁻¹ (pH 9,5), Ca(ClO) ₂ = 30 mg L ⁻¹ em tampão fosfato 10 mmol L ⁻¹ (pH 6,8), PC =	

pré-coluna C₁₈ 5 x 4,6 mm, CM = coluna monolítica C₁₈ 25 x 4,6 mm, D = detector de fluorescência.52

Figura 8: Reações utilizadas. (a) Conversão do GLYPH a GLY (b) Formação de produtos fluorescentes a partir da GLY e AMPA.....59

Figura 9: Cromatogramas: (a) sistema onde não ocorre a adição de solução não-tratada com ClO⁻. (b) sistema onde ocorre a adição de solução não-tratada com ClO⁻. (1) Produto fluorescente derivado do AMPA. (2) Produto derivado do GLYPH. Atribuição de picos: 1 = AMPA; 2 = GLYPH. Condições da análise: Volume amostrado: 200 µL; Concentração de AMPA e GLYPH: 3,2 µmol L⁻¹; Fase móvel: 30 : 70 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8); Vazão da etapa de eluição: 25 µL s⁻¹; Detecção: λ_{excitação} = 334 nm e λ_{emissão} = 440 nm61

Figura 10: Cromatogramas: (a) sistema não aquecido. (b) sistema aquecido a 48°C. (1) Produto fluorescente derivado do AMPA. (2) Produto derivado do GLYPH. Atribuição de picos: 1 = AMPA; 2 = GLYPH. Condições da análise: Volume amostrado: 200 µL; Concentração de AMPA e GLYPH: 3,2 µmol L⁻¹; Fase móvel: 30 : 70 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8); Vazão da etapa de eluição: 25 µL s⁻¹; Detecção: λ_{excitação} = 334 nm e λ_{emissão} = 440 nm62

Figura 11: Cromatogramas: (a) análise em água com fase móvel 30 : 70 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8), (b) análise em extrato aquoso de solo com fase móvel 30 : 70 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8) e (c) análise em extrato aquoso de solo com fase móvel 15 : 85 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8). Atribuição de picos: 1 = AMPA; 2 = GLYPH; 3 = conteúdo orgânico presente no extrato de solo. Condições da análise: Volume amostrado: 200 µL; Concentração de

AMPA e GLYPH: $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$; Vazão da etapa de eluição: $25 \mu\text{L s}^{-1}$; Detecção: $\lambda_{\text{excitação}} = 334 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 440 \text{ nm}$64

Figura 12: Cromatogramas de (a) comparação entre derivado de AMPA e separação de derivados AMPA e GLYPH, (c) comparação entre derivado de GLYPH e separação de derivados de AMPA e GLYPH, (a) separação de derivados de AMPA e GLYPH e (d) comparação entre derivados de GLYPH e GLY. Condições da análise: Volume amostrado: $200 \mu\text{L}$; Concentração de AMPA e GLYPH: $3,2 \mu\text{mol L}^{-1}$; Fase móvel: 15 : 85 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,8); Vazão da etapa de eluição: $25 \mu\text{L s}^{-1}$; Detecção: $\lambda_{\text{excitação}} = 334 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 440 \text{ nm}$ 65

Figura 13: Sinais relativos de fluorescência para soluções padrões com AMPA e GLYPH em diferentes concentrações. Sinais relativos de fluorescência para soluções padrões com AMPA e GLYPH em diferentes concentrações. Atribuição de picos: 1 = AMPA; 2 = GLYPH. Condições da análise: Volume amostrado: $200 \mu\text{L}$; Fase móvel: 15 : 85 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,8); Vazão da etapa de eluição: $25 \mu\text{L s}^{-1}$; Detecção: $\lambda_{\text{excitação}} = 334 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 440 \text{ nm}$69

Figura 14: Curvas analíticas obtidas em 3 dias seguidos para AMPA e GLYPH. Condições da análise: Volume amostrado: $200 \mu\text{L}$; Fase móvel: 15 : 85 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,8); Vazão da etapa de eluição: $25 \mu\text{L s}^{-1}$; Detecção: $\lambda_{\text{excitação}} = 334 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 440 \text{ nm}$ 71

Figura 15: Efeito do tempo de contato na adsorção do GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentração do GLYPH $40 \mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C 77

Figura 16: Teste do modelo de pseudo-primeira ordem para a adsorção de GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentração do GLYPH $40 \mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C 79

Figura 17: Teste do modelo de pseudo-segunda ordem para a adsorção de GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentração do GLYPH $40 \mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C 80

Figura 18: Teste do modelo de difusão intrapartícula para a adsorção de GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentração do GLYPH $40 \mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C 81

Figura 19: Isotermas de adsorção do GLYPH ajustadas aos modelos de (a) Freundlich e (b) Langmuir em diferentes amostras de solo. Condições: concentrações do GLYPH $10\text{-}640 \mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C 85

Figura 20: Isotermas de dessorção do GLYPH ajustadas aos modelos de (a) Freundlich e (b) Langmuir em diferentes amostras de solo. Condições: concentrações do GLYPH $10\text{-}640 \mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os 10 ingredientes ativos para agrotóxicos mais vendidos no Brasil no ano de 2016	21
Tabela 2: Características dos solos utilizados	51
Tabela 3: Etapas para a análise sequencial do GLYPH e AMPA	53
Tabela 4: Comparação de parâmetros cromatográficos para os dois métodos para a análise de GLYPH e AMPA.....	66
Tabela 5: Efeito de possíveis interferentes na determinação do GLYPH e AMPA. Concentração nominal do GLYPH e AMPA de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Concentrações dos interferentes são de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$	68
Tabela 6: Desempenho do método cromatográfico por injeção sequencial	70
Tabela 7: Avaliação de precisão: testes de repetitividade e precisão intermediária em 3 concentrações diferentes para AMPA e GLYPH	72
Tabela 8: Ensaios de recuperação em diferentes matrizes para AMPA e GLYPH em 3 níveis de concentração	73
Tabela 9: Determinação de AMPA e GLYPH em amostras de água em três níveis de concentração.....	75
Tabela 10: Determinação de GLYPH em formulação comercial em dois níveis.....	76
Tabela 11: Parâmetros cinéticos para a adsorção de GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentração do GLYPH $40 \mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C	83

Tabela 12: Parâmetros de Freundlich e Langmuir para a adsorção e dessorção de GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentrações do GLYPH 10-640 $\mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C.....86

Tabela 13: Comparação de parâmetros de Freundlich para diferentes solos em diferentes estudos87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. AGRICULTURA E PESTICIDAS	19
1.2. GLIFOSATO	21
1.2.1. Informações gerais.....	21
1.2.2. Comportamento no meio ambiente	26
1.2.3. Legislação.....	31
1.2.4. Métodos analíticos	33
1.3. CROMATOGRAFIA POR INJEÇÃO SEQUENCIAL (SIC)	36
1.3.1. Sistemas de análise por injeção sequencial	36
1.3.2. Colunas monolíticas	38
1.3.3. Sistemas cromatográficos por injeção sequencial	40
1.4. ESTUDOS DE ADSORÇÃO-DESSORÇÃO	43
1.4.1. Modelo de Langmuir.....	44
1.4.2. Modelo de Freundlich.....	45
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.....	47
3. EXPERIMENTAL	48
3.1. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	48
3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES	49
3.3. AMOSTRAS	50
3.3.1. Amostras de água	50
3.3.2. Amostras de solo	50
3.4. PROCEDIMENTOS	51
3.4.1. Análise do GLYPH e AMPA com o SIC.....	51

3.4.2. Estudo de adsorção-dessorção	55
3.4.3. Tratamento de dados	57
4. RESULTADOS E DICUSSÃO	59
4.1. REAÇÕES ENVOLVIDAS	59
4.2. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS	60
4.2.1. Corrida cromatográfica	60
4.2.2. Aquecimento	61
4.2.3. Fase móvel	62
4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	65
4.3.1. Confirmação de picos e parâmetros cromatográficos	65
4.3.2. Estudos de interferência	67
4.3.3. Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação	69
4.3.4. Avaliação de precisão	72
4.3.5. Avaliação de exatidão	73
4.4. DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO EM AMOSTRAS DE ÁGUA	74
4.5. DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO EM FORMULAÇÃO COMERCIAL	75
4.6. ESTUDOS DE ADSORÇÃO-DESSORÇÃO	76
4.6.1. Cinética de adsorção	76
4.6.2. Isotermas de adsorção e dessorção	84
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
7. ANEXO	I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agricultura e pesticidas

A população mundial em 1950 era de aproximadamente de 2,5 bilhões de pessoas. Em 2017, este número atingiu 7,6 bilhões e estimativas das Nações Unidas supõem que o mesmo irá chegar a 9,8 bilhões em 2050 e 11,2 bilhões até 2100. Além disso, a expectativa de vida média ao nascer avançou 3,6 anos do período de 2000-2005 para 2010-2015, ou seja, de 67,2 para 70,8 anos (Nações Unidas, 2017).

Levando-se em consideração o incremento que a população mundial sofrerá ao longo das próximas décadas e o elevado número de pessoas que ainda vivem em situação de subnutrição (FAO, 2015), o aumento da produção de alimentos sem um acréscimo drástico às áreas destinadas ao cultivo de *commodities* agrícolas é um dos grandes desafios enfrentados pela humanidade no presente e continuará a ser no futuro.

Dentre as estratégias comumente referidas quando se pensa em aumento da produtividade de *commodities* agrícolas, destacam-se: o uso de agrotóxicos, fertilizantes orgânicos, diferentes mecanismos de controle biológico, práticas de melhoramento de solo e adequado gerenciamento de recursos hídricos. A cultivação de variedades geneticamente modificadas, introduzidas na década de 1990, também figura entre as possíveis soluções para o aumento da produção sem o avanço substancial do desflorestamento, contudo, a mesma ainda é motivo de fervorosos debates (Azadi & Ho, 2010; Carvalho, 2006).

O uso de agroquímicos (fertilizantes químicos e pesticidas) é uma prática consolidada em todo o mundo, seu uso foi decisivo no aumento da produção agrícola ocorrida entre as décadas de 1930 e 1960, período também conhecida como “revolução verde” ou “terceira revolução agrícola”. A categoria dos pesticidas, que inclui inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, dentre outros, é responsável por proteger culturas de diferentes pestes, o que permite o aumento da produtividade em culturas como milho, algodão, soja, legumes, etc. Dentre os diferentes compostos químicos utilizados como pesticidas, as quatro principais classes são: os organoclorados, os piretróides, os organofosforados e os carbamatos (Carvalho, 2006; Oliveira-Silva et al., 2001).

No Brasil, a intensificação do uso de agrotóxicos se deu entre as décadas de 1950 e 1970 com a implantação de políticas que visavam modernizar a agricultura do país. Com o apoio direto do governo federal, a indústria de agroquímicos se instalou e linhas de crédito rural foram criadas. Como consequência, uma prática foi consolidada: a monocultura aliada ao uso dos defensivos agrícolas (Abreu & Alonzo, 2014; Franco & Pelaez, 2016).

Desde 2008, o Brasil é o país onde mais se consume agrotóxicos em todo mundo (Rossi, 2015). Em 2014, cerca de 430 ingredientes ativos e 2400 formulações estavam cadastradas perante os órgãos responsáveis pelo seu registro e monitoramento: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Dentre os 50 agrotóxicos mais utilizados em lavouras brasileiras, 22 tiveram seu uso proibidos em países da União Europeia (Freitas et al., 2014). A Tabela 1 traz informações sobre os ingredientes ativos para agrotóxicos mais vendidos no ano de 2016 no Brasil. O glifosato consta como o mais

vendido com mais de 185 mil de toneladas do herbicida, superando o segundo colocado, o 2,4-D, em mais de três vezes (IBAMA, 2016).

Tabela 1: Os 10 ingredientes ativos para agrotóxicos mais vendidos no Brasil no ano de 2016

Ingrediente Ativo	Vendas (toneladas)	Ranking
<i>Glifosato e seus sais</i>	185.602,22	1º
<i>2,4-D</i>	53.374,41	2º
<i>Mancozebe</i>	33.232,94	3º
<i>Atrazina</i>	28.615,70	4º
<i>Óleo mineral</i>	27.801,09	5º
<i>Acefato</i>	24.858,68	6º
<i>Óleo vegetal</i>	17.259,26	7º
<i>Carbendazim</i>	13.364,67	8º
<i>Dicloreto de paraquate</i>	11.638,19	9º
<i>Imidacloprido</i>	9.165,97	10º

Fonte: IBAMA/Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002

1.2. Glifosato

1.2.1. Informações gerais

O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] é um herbicida, pertencente ao grupo das glicinas substituídas, classificado como pós-emergente, não-seletivo e de ação sistêmica. Introduzido pela empresa norte-americana Monsanto na primeira metade da década de 1970, o glifosato (GLYPH) é um dos herbicidas mais utilizados no controle

de plantas daninhas em todo mundo. Com o avanço da biotecnologia e técnicas de engenharia genética, sementes de diferentes culturas (milho, soja, algodão, entre outras) vêm sendo geneticamente modificadas para tolerar o herbicida, elevando consideravelmente o seu consumo ao longo das últimas décadas (Grossman, 2015; Possidônio De Amarante Junior et al., 2002).

O sucesso do GLYPH é creditado principalmente por sua baixa toxicidade aguda a organismos não-alvo aliada à sua alta eficiência na eliminação de ervas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas. Contudo, em formulações comerciais como o Roundup® da Monsanto, outros componentes como polioxietileno aminas (POEAs) estão presentes. Acredita-se que esses surfactantes sejam mais tóxicos que o próprio ingrediente ativo (Borggaard & Gimsing, 2008). O GLYPH é comercializado na forma de diferentes sais, dentre eles sais de potássio, de sódio, de amônio, diamônio e isopropilamina. Com massa molecular para o ácido de 169,07 g mol⁻¹, o GLYPH e seus sais são solúveis em água (12 g L⁻¹ a 25°C) e quase insolúveis em solventes orgânicos como acetona, etanol e xileno (Possidônio De Amarante Junior et al., 2002). O mecanismo de ação do GLYPH consiste na inibição competitiva da 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), uma enzima ausente em animais, essencial para a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano em plantas. Como resultado do bloqueio da biossíntese destes aminoácidos, a planta morre com a aplicação do herbicida (Bolognesi et al., 1997).

Encontrado como um pó branco inodoro, o GLYPH funde a 189,5°C, pode ser decomposto quando exposto a temperaturas maiores que 234°C e apresenta densidade de 1,7 g cm⁻³. Ácido e sais do herbicida não são voláteis, não são degradados fotoquimicamente e são estáveis quando expostos ao ar. Os valores de pK_a listados

para o GLYPH são $pK_{a1} = 0,8$; $pK_{a2} = 2,23$; $pK_{a3} = 5,46$ e $pK_{a4} = 10,14$ (Database National Center for Biotechnology Information, n.d.; Tamlin, 1997).

Por ser derivado de um aminoácido, o GLYPH pode apresentar comportamento zwitteriônico, ou seja, apresentar mais de um grupo funcional, onde uma região contém cargas negativas (grupo carboxila e fosfonato) e outra cargas positivas (grupo amino). Em suas ionizações, o GLYPH perde primeiro os hidrogênios ligados a oxigênios e por último o que está ligado a um nitrogênio. As etapas podem ser vistas na Figura 1.

Figura 1: Dissociação do glifosato

O elevado consumo de herbicidas baseados no GLYPH ao longo das últimas décadas tem sido motivo de preocupação para diferentes autoridades, e o debate sobre seu impacto na saúde humana é recorrentemente discutido por diferentes órgãos regulatórios em todo mundo.

No ano de 2015, dois relevantes pareceres sobre a carcinogenicidade de formulações contendo GLYPH foram anunciados. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), órgão intergovernamental ligada a Organização Mundial de Saúde (OMS) das Nações Unidas (ONU), anunciou em março naquele ano que em sua monografia sobre a avaliação de inseticidas e herbicidas organofosforados, o herbicida GLYPH e seus produtos formulados passariam a ser considerados possíveis carcinogênicos para humanos (International Agency for Research on Cancer, 2015). Já a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*), órgão ligado a União Europeia, publicou um relatório (em novembro de 2015) afirmando que é “pouco provável o GLYPH apresente perigo carcinogênico a humanos e evidências não condizem com a ideia de classificá-lo como potencial carcinogênico” (EFSA, 2015).

Conclusões antagônicas, como as da IARC e EFSA, tornaram o debate sobre o risco relacionado a utilização do herbicida mais aquecido. Tarazona pondera que tais divergências podem estar ligadas a utilização de diferentes conjuntos de dados, diferentes abordagens e métodos, ou diferentes interpretações na análise resultados ambíguos (Tarazona et al., 2017).

1.2.2. Comportamento no meio ambiente

Quando o GLYPH é liberado no meio ambiente, diversos fatores podem determinar o seu ciclo de vida. Dentre estes fatores, podemos citar a formação de complexos em água, a sorção a sedimentos ou partículas suspensas, incorporação por plantas e a biodegradação por micro-organismos.

Segundo a Monsanto, o GLYPH “se une fortemente a partículas de solo, o que significa que não se espera seu deslocamento para cursos d’água e lençóis freáticos” (Monsanto Company, 2018). Já a Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) afirma que o GLYPH “adsorve fortemente ao solo e não é esperado encontrá-lo em camadas abaixo de 6 polegadas (aproximadamente 15 cm); espera-se que resíduos estejam imobilizados no solo” (US EPA, 1993). No entanto, estudos que visam avaliar a lixiviabilidade do GLYPH frente diferentes condições têm levantado a possibilidade de encontrá-lo em camadas mais profundas no solo e em águas superficiais (Sasal et al., 2015).

A mobilidade de um composto em solo depende de sua capacidade de ser sorvido ou não, ou seja, forte sorção a constituintes sólidos do solo resulta em imobilização enquanto que fraca sorção pode levar a lixiviação. Quando comparado com outros pesticidas, o GLYPH apresenta características de sorção únicas. Devido à presença de três grupos funcionais polares (carboxílico, amino e fosfonato), o herbicida é fortemente adsorvido por solos minerais. Por outro lado, quase todos os outros herbicidas são fracamente ou moderadamente sorvidos em solo (essa sorção se dá principalmente em solos com alto teor de matéria orgânica), pois são dominados pela presença de grupos apolares. (Borggaard & Gimsing, 2008).

O GLYPH é sorvido apenas em superfícies com cargas variáveis, uma vez que é encontrado como ânion no intervalo usual de valores de pH para solos. Portanto, seus principais sítios de ligação são encontrados em compostos como óxidos de alumínio e ferro e alumino-silicatos pouco ordenados (Borggaard & Gimsing, 2008). A adsorção do GLYPH a superfícies de minerais de Fe e Al é geralmente explicada pela formação de complexos de superfície. Acredita-se que estes complexos são monodentados e mononucleares, contudo a formação de complexos bidentados e binucleares não é descartada (Borggaard & Gimsing, 2008; Sheals et al., 2002). Possíveis mecanismos para a formação desses complexos são observados na Figura 2.

Figura 2: Possíveis mecanismos para a sorção do GLYPH em óxidos de ferro. A) formação de complexo mononuclear e monodentado. B) formação de complexo binuclear e bidentado. C) formação de complexo mononuclear e monodentado a partir de complexo binuclear e bidentado. Adaptado de (Borggaard & Gimsing, 2008)

A forma como a matéria orgânica presente no solo influencia a adsorção do GLYPH não é completamente compreendida. Alguns estudos indicam a possibilidade

de a matéria orgânica reduzir a sorção do GLYPH devido ao bloqueio de sítios de ligação, ao passo que outros sugerem o aumento da sorção do herbicida na presença de matéria orgânica do solo, uma vez que óxidos de Al e Fe pouco ordenados com alta capacidade de sorção são favorecidos em maiores concentrações de matéria orgânica. (Borggaard & Gimsing, 2008). Albers e colaboradores argumentam que a adsorção de GLYPH em solos naturais não é dominada por apenas um único parâmetro de solo e que a matéria orgânica pode ser parcialmente responsável pela da sorção do herbicida (Albers et al., 2009).

O fosfato inorgânico e o GLYPH apresentam mecanismos de sorção similares, uma vez que ambos formam fortes ligações Al–O–P ou Fe–O–P com superfícies de cargas variáveis Al–OH e Fe–OH. A semelhança nos mecanismos de adsorção do GLYPH e fosfato sugere a possibilidade de competição entre as espécies por sítios de adsorção. Competições de tal magnitude podem ter impacto direto na quantidade de GLYPH ligado aos sólidos constituintes do solo e sua lixiviabilidade, considerando a quantidade de fosfato adicionada rotineiramente a solos na forma de fertilizantes. Estudos tentando avaliar qual das espécies é preferencialmente adsorvida demonstraram o favorecimento do fosfato inorgânico em minerais como goethita e gibbsita. Contudo, é mais provável a coexistência de sítios comuns às duas espécies (em que é observada competição), enquanto outros sítios sejam específicos para cada espécie ou permitam sorção em dois planos (Borggaard & Gimsing, 2008; Gimsing & Borggaard, 2002; Gimsing et al., 2004; Munira et al., 2016). A Figura 3 ilustra a competição das espécies por sítios de ligação em superfície de óxido de Fe.

Figura 3: Sorção de GLYPH e fosfato inorgânico. A) Competição entre GLYPH e fosfato inorgânico. B) Sorção em dois planos. Fonte: (Borggaard & Gimsing, 2008)

A degradação do GLYPH em solo ocorre essencialmente na presença de microrganismos. Estes microrganismos degradam o GLYPH em duas possíveis rotas: uma com a formação de intermediários como a sarcosina e glicina (GLY) e outra com a formação do ácido aminometilfosfônico, o AMPA (Araújo et al., 2003; Borggaard & Gimsing, 2008; Sviridov et al., 2015). A degradação pela via da sarcosina se inicia pela quebra da ligação C–P com uma enzima do tipo C–P liase produzindo fosfato inorgânico e sarcosina. Na presença da sarcosina oxidase, a sarcosina é degradada a GLY e formaldeído. O formaldeído entra no ciclo do tetrahidrofolato e a GLY é metabolizada até formar dióxido de carbono e amônio (Borggaard & Gimsing, 2008). Na rota do AMPA, a degradação se inicia com a cliva gem da ligação C–N pela enzima glifosato oxirredutase, gerando AMPA e glioxilato. O glioxilato entra no ciclo do glioxilato, enquanto o AMPA é clivado com a C–P produzindo fosfato inorgânico e metilamina, que

é degradado a CO_2 e NH_3 (Borggaard & Gimsing, 2008; Grandcoin et al., 2017). O esquema com as rotas de degradação é ilustrado na Figura 4.

Figura 4: Degradação microbiana do GLYPH pelas rotas da Sarcosina e AMPA

A rota de degradação mais comum no solo, dentre as duas citadas, ainda não foi determinada. O AMPA é comumente encontrado em solos que foram tratados com formulações baseadas em GLYPH, enquanto a detecção de sarcosina em solo não é relatada. Esta diferença pode ser explicada pela possibilidade de uma rápida degradação da sarcosina, ao passo que o AMPA fica adsorvido a componentes sólidos

constituintes do solo através do grupo fosfanato assim como o GLYPH, o que pode dificultar sua degradação microbiana (Borggaard & Gimsing, 2008).

1.2.3. Legislação

Em todo o mundo, diferentes órgãos e agências são responsáveis pelo controle da liberação de poluentes no meio ambiente. Dentro das atribuições destas entidades, está o estabelecimento de quantidades limites que possam estar presentes em água, solo, ar e alimentos, de forma a não comprometer a saúde dos organismos presentes nestes sistemas ou daqueles irão consumi-los.

Nos EUA, a US EPA recomenda que os níveis de GLYPH em águas utilizadas para consumo humano não ultrapasse $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ (US EPA, 1995). Este limite foi estabelecido considerando-se o fato de não haver evidências de efeitos adversos para a saúde humana em tal concentração. Já a Comissão Europeia (EC, do inglês *European Commission*), instituição ligada a União Europeia, em sua Diretiva 98/83/CE DO CONSELHO, não estabelece um limite exclusivo para o GLYPH, mas determina que o nível máximo admissível para qualquer pesticida individual em água destinada ao consumo humano é de $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, desde que a concentração total de pesticidas não exceda $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (Comissão Europeia, 1998). Em âmbito nacional, o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), órgão consultivo e deliberativo do Sistema Nacional do Meio Ambiente ligado ao Ministério do Meio Ambiente, estabelece que o valores máximos para a concentração do GLYPH em águas doces e águas subterrâneas. Na resolução nº 357 de 17 de março de 2005, o valor é de $65 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para

águas doce do tipo 1 e $280 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas doce do tipo 3 (CONAMA, 2005). Já a resolução nº 396 de 3 de abril de 2008, estabelece o valor máximo permitido de GLYPH + AMPA em águas subterrâneas utilizadas para o consumo humano em $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (CONAMA, 2008).

O limite máximo de resíduos (LMR), conforme definição da ANVISA, é “a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim legalmente aceita no alimento decorrente de aplicação adequada em fase específica”. Ele é expresso em mg do agrotóxico por kg do alimento de interesse. A Comissão Europeia determina LMRs de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para diversas frutas e hortaliças, enquanto que para algumas culturas que apresentam parte de sua produção com sementes geneticamente modificadas, a recomendação é consideravelmente maior, como 1 mg kg^{-1} para milho, 10 mg kg^{-1} para algodão e 20 mg kg^{-1} para sorgo e soja (Comissão Europeia, 2018). Já nos EUA, a agência de proteção ambiental estabelece limites de tolerância entre 0,1 a 310 mg kg^{-1} , sendo para 210 mg kg^{-1} para algodão, $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ para milho e 20 mg kg^{-1} para soja (US EPA, 2018). No Brasil, a ANVISA determina limites para frutos entre 0,02 e $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$, para cereais a tolerância pode variar entre 0,05 e $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ e para as culturas algodão, milho e soja, os valores 3, 1 e 10 mg kg^{-1} são, respectivamente, aceitos (ANVISA, n.d.).

De um modo geral, não há legislações vigentes com relação ao estabelecimento de limites de resíduos de glifosato em solo. Contudo, há normas e critérios com relação a avaliação do impacto toxicológico de pesticidas, sendo que muitas vezes estes estão acompanhados de estudos de biodegradabilidade, adsorção-dessorção e mobilidade (Possidônio De Amarante Junior et al., 2002).

1.2.4. Métodos analíticos

Com elevada polaridade, alta solubilidade em água, insolubilidade em solventes orgânicos e baixa volatilidade, o GLYPH e o AMPA não apresentam em suas estruturas regiões que atuam como cromóforos ou fluoróforos. Por tais motivos, a determinação destas espécies se mostra complicada, requerendo a realização de adaptações que a torne possível. Tais adaptações são representadas principalmente por derivatizações ou alterações de propriedades físico-químicas do GLYPH e AMPA. Para amostras ambientais, a maioria dos métodos é baseada em separações cromatográficas com etapas de derivatizações pré ou pós-coluna explorando diferentes sistemas de detecção (Coutinho et al., 2008; Colombo & Masini, 2014).

Na literatura, encontram-se métodos utilizando detecção UV-Vis na quantificação do GLYPH em diferentes matrizes. Khrolenko e Wieczorek propuseram um método cromatográfico para a determinação de GLYPH e AMPA em diferentes sucos de frutas explorando uma derivatização com cloreto de *p*-toluenossufonila (Khrolenko & Wieczorek, 2005). Islas e colaboradores reportaram um método que utiliza a derivatização pré-coluna com 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio para a determinação do herbicida e seu produto de degradação em amostras de solo (Islas et al., 2014). Um método para avaliar a presença do GLYPH e AMPA em amostras água de torneira foi proposto por Delmonico e colaboradores (Delmonico et al., 2014). Amostras ambientais também foram o alvo do método proposto por Qian e colaboradores os quais utilizam uma derivatização pré-coluna com 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto (Qian et al., 2009).

Determinações com detecção por espectrometria de massas também são comuns. Com o intuito de se quantificar GLYPH e AMPA em amostras de água, solo e vegetação, Marek e Koskinen propõem um método com a utilização de um cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas em tandem (Marek & Koskinen, 2014). Chamkasem e Harmon empregam um sistema do tipo quadrupolo-íon *trap* na determinação direta do GLYPH, glufosinato e AMPA em amostras de soja e milho (Chamkasem & Harmon, 2016). Na tentativa de determinar a presença de GLYPH em vacinas, Lee e colaboradores desenvolveram métodos utilizando espectrometria de massas em tandem e quadrupolo-*orbitrap* acoplados a cromatógrafos a líquido (Lee et al., 2017). A espectrometria de massas também vem sendo aplicada na investigação da presença do GLYPH em fluídos biológicos como urina (Saito et al., 2012) e leite materno (Steinborn et al., 2016).

Há, ainda, trabalhos que empregam sistemas de detecção eletroquímica. Coutinho e colaboradores empregam um sistema para a determinação coulométrica do GLYPH e AMPA com um eletrodo de cobre utilizando uma coluna de troca aniônica (Coutinho et al., 2008). Um método para a determinação direta dos herbicidas glufosinato, bialaphos e GLYPH com detecção por amperometria pulsada integrada é proposto por Sato e colaboradores (Sato et al., 2001). Sensores eletroquímicos também são propostos. Songa e colaboradores prepararam um biossensor para a detecção do GLYPH com a deposição eletroquímica de poli-(2,5-dimetóxi-anilina) (PDMA) dopado com ácido poli-(estirenosulfônico) (PSS) na superfície de um eletrodo de ouro seguida da incorporação da enzima HRP no filme do compósito PDMA-PSS (Songa et al., 2009). Trabalhos utilizando polímeros molecularmente impressos também são encontrados (Prasad et al., 2014; Zhang et al., 2017).

Dentre os métodos que utilizam separações cromatográficas, sistemas de detecção por fluorescência estão entre os mais utilizados. Dentre os reagentes mais empregados na formação de espécies fluorescentes estão o *o*-ftaldialdeído com 2-mercaptoetanol (OPA-ME) e o 9-fluormetil-cloroformato (FMOC-Cl). Nos trabalhos com o OPA-ME, derivatizações pós-coluna são as mais utilizadas (Catrinck et al., 2014; Nedelkoska & Low, 2004). Já derivatizações com o FMOC-Cl são comumente feitas antes da separação (Cowell et al., 1986; Mallat & Barceló, 1998).

A US EPA propõe um método cromatográfico para a determinação do GLYPH em amostras de água. No método, uma alíquota de uma amostra de água é injetada no sistema cromatográfico passando por uma coluna de troca catiônica. A separação se dá utilizando eluição isocrática. Após a eluição, o GLYPH é convertido a GLY em presença de hipoclorito de cálcio (ClO^-). O produto resultante da conversão (GLY) reage com *o*-ftaldialdeído em presença do 2-mercaptoetanol (OPA-ME), formando um produto fluorescente. O composto fluorescente é excitado com radiação de comprimento de onda de 340 nm e pode ser detectado devido a emissões em comprimentos de onda menores que 455 nm (US EPA, 1990).

Outras técnicas também vindo sendo aplicadas na determinação do GLYPH. Dentre delas, podemos citar a análise de fluídos biológicos utilizando RMN de ^1H e ^{31}P (Cartigny et al., 2004), de amostras de água com espectroscopia de refletância difusa (Da Silva et al., 2011) e a determinação do herbicida entre produtos da oxidação do ácido N-(fosfonometil) iminodiacético com espectroscopia de infravermelho (Yushchenko et al., 2013).

1.3. Cromatografia por injeção sequencial (SIC)

1.3.1. Sistemas de análise por injeção sequencial

Técnicas de análise em fluxo são hoje muito bem estabelecidas em Química Analítica. Sua consolidação se deve a características como versatilidade de configurações, facilidade de operação, baixo custo e compatibilidade com diferentes detectores (Pinto et al., 2011).

Desenvolvidos no início da década de 1990, os primeiros sistemas de análise por injeção sequencial (SIA, do inglês *Sequential Injection Analysis*) foram propostos como alternativas aos sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*), que apresentavam dois problemas que impediam a popularização da técnica na monitoração automática de processos industriais: a necessidade de diferentes configurações mecânicas para diferentes analitos e a necessidade frequente de manutenção. Com as melhorias propostas, os sistemas do tipo SIA possibilitaram a implementação de métodos em fluxo em monitoramentos *on-line* de processos industriais (Lenehan et al., 2002; Masini, 2008).

Um típico sistema SIA é constituído de uma válvula seletora, uma bomba de pistão (ou peristáltica), uma linha única de transmissão e um sistema de detecção. Um computador é utilizado para o controle do sistema e a aquisição de dados, ele permite a aspiração de volumes precisos e uma efetiva utilização das soluções, minimizando o consumo de amostra e reagentes e geração de efluentes. A válvula seletora, referida muitas vezes como o “coração” do sistema, é controlada em sincronia com a bomba e

permite a comunicação com diferentes portas, que podem ser conectadas a reagentes, amostra, padrões, bobinas auxiliares, detectores e reservatório de resíduos (Lenehan et al., 2002; Masini, 2008; Pinto et al., 2011).

Durante a realização de uma análise, volumes pré-determinados de reagentes e amostra são admitidos sequencialmente para o interior da bobina coletora. Com a reversão da direção do fluxo, a zona amostral é enviada para o detector, passando antes por uma bobina de reação, que garante um percurso analítico mínimo para a sobreposição de reagentes e amostra por efeitos de dispersão e difusão (Dos Santos & Masini, 2010). Um esquema de um típico sistema SIA é apresentado na Figura 5.

Figura 5: Típico sistema SIA. SP = solução transportadora, BP = bomba peristáltica, BC = bobina coletora, BR = bobina reacional, D = detector, VR = válvula rotatória (ou seletora), W = descarte, R1 = reagente 1, A = amostra, R2 = reagente 2

Tempo de reação, concentração de reagentes e condições experimentais que permitem elevado grau de sobreposição das zonas de reagente e amostra (conjuntamente com parâmetros físicos como diâmetro, comprimento e geometria do

reator) devem ser considerados durante o desenvolvimento de uma metodologia analítica em um sistema SIA (Dos Santos & Masini, 2010).

1.3.2. Colunas monolíticas

Em cromatografia líquida, colunas empacotadas preparadas a partir de sílica são de longe as mais utilizadas. As partículas de sílica são frequentemente recobertas com filmes orgânicos finos, que são quimicamente ou fisicamente ligados a superfície, tornando possível a existência de diferentes polaridades na fase estacionária. A maioria dessas colunas apresenta tamanhos que variam entre 5 e 25 cm com diâmetro interno de 3 a 5 mm, sendo que os tamanhos de partícula mais comuns são de 3 e 5 μm . Colunas deste tipo podem apresentar de 40 a 70 mil pratos por metro de coluna (Skoog et al., 2014).

Ao longo de décadas, o desenvolvimento de melhores colunas para cromatografia líquida foi alvo de interesse para diversos pesquisadores e fabricantes, e ainda hoje é motivação para o trabalho de muitos em todo o mundo. A capacidade de se produzir partículas cada vez menores e bem definidas, aliada a menores diâmetros e comprimentos de coluna, tornou possível a realização de separações cromatográficas cada vez mais eficientes. Entretanto, essa diminuição de tamanho de partícula apresenta um limite de desempenho em equipamentos tradicionais, já que ocorre um aumento considerável de resistência ao fluxo da fase móvel, ocasionando queda de pressão ao longo da coluna. Novas soluções são buscadas para se contornar o

impasse gerado pelo aumento de pressão frente à diminuição do tamanho das partículas constituintes das colunas empacotadas (Faria et al., 2006).

Colunas monolíticas consistem de uma “partícula única” de material poroso e contínuo que é hermeticamente selado contra a parede de um tubo de forma a forçar a percolação da fase móvel pelo material em questão. Estes materiais são frequentemente caracterizados por sua distribuição bimodal de tamanho de poros. Os poros de maior tamanho são os macroporos (diâmetros superiores a 50 nm), os quais estão interconectados em canais pelos quais praticamente toda a fase móvel flui. Os tamanhos médios destes canais controlam a permeabilidade da coluna e, como consequência, a pressão em que a fase móvel deve ser bombeada para se manter a vazão desejada. O modo de menor tamanho para monólitos inorgânicos corresponde aos mesoporos (tamanhos entre 2 e 50 nm). Estes mesoporos são constituídos por aglomerados sólidos e porosos que estão entre os canais que constituem os macroporos. De um modo geral, os mesoporos conferem grande área superficial ao material e são uniformes o suficiente para que se possa obter eficientes separações cromatográficas (Guiochon, 2007).

Estas colunas podem ser classificadas de acordo com o material utilizado em sua produção: colunas monolíticas baseadas em polímeros orgânicos e colunas monolíticas baseadas em sílica. A facilidade com que se podem incorporar diferentes grupos funcionais durante o preparo das fases monolíticas e a possibilidade de se realizar análises com a aplicação de elevadas vazões de fase móvel sem perdas significativas de eficiência cromatográfica são vantagens que tornam as colunas monolíticas alternativas para as tradicionais colunas empacotadas (Faria et al., 2006).

Preparada em formato cilíndrico, a sílica monolítica, diferentemente das baseadas em monólitos poliméricos, não pode ser preparada em tubos de aço inoxidável. Uma etapa pós-síntese de calcinação faz com que o cilindro monolítico sofra encolhimento, perdendo contato com a parede interna do tubo. Neste caso, o monólito de sílica é retirado do molde e transferido para um tubo de plástico termo retrátil, que sob aquecimento, se contrai sobre o monólito (Faria et al., 2006). Dificuldades na realização destes procedimentos acabam limitando a fabricação destas colunas para grupos que dispõem de tecnologia e instrumentação específica para sua construção.

Alguns processos de preparação dessas colunas foram patenteados e colunas de sílica de fase-reversa C_{18} passaram a ser comercializadas em 2000 pela Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) (Guiochon, 2007).

1.3.3. Sistemas cromatográficos por injeção sequencial

O primeiro sistema explorando cromatografia por injeção sequencial (SIC, do inglês *Sequential Injection Chromatography*) foi proposto em 2003 por Huclová e colaboradores (Huclová et al., 2003). Utilizando-se uma coluna monolítica de sílica porosa em um sistema SIA com bomba de seringa, o grupo separou ácido salicílico e metil-salicilato em preparações farmacêuticas.

O SIC se baseia nos mesmos princípios de funcionamento do SIA: soluções são aspiradas sequencialmente (devido a rotação da válvula seletora), enviadas para uma bobina coletora e são posteriormente dispensadas na coluna cromatográfica. Com a

eluição, os compostos separados são detectados pelo sistema de detecção escolhido (Chocholouš et al., 2007; Idris, 2014). Um sistema SIC típico pode ser visto na Figura 6.

Figura 6: Típico sistema SIC. W = descarte, D = detector, CM = coluna monolítica, PC = pré-coluna, R1 = reagente 1, R2 = reagente 2, A = amostra, VR = válvula rotatória (ou seletora), BC = bobina coletora, VA = válvula de alívio, BS = bomba de seringa, FM = fase móvel

Nos sistemas comerciais atuais, o volume da seringa da bomba pode variar entre 4 e 10 mL com pressões de até 1000 psi. A bomba de seringa (BS) possui 3 portas: uma ligada a bobina coletora (BC), outra a uma válvula de alívio (VA) e uma terceira ao reservatório com fase móvel (FM). O comprimento dos tubos utilizados na bobina coletora varia entre 100 e 500 cm, enquanto seu diâmetro interno é encontrado entre 0,51 e 0,76 mm. A válvula de alívio é usada para atenuar a pressão gerada durante a separação na coluna e abre a pressões > 500 psi. A válvula seletora é, em geral, encontrada com 8, 10 ou 12 portas, além da porta central. Estas portas estão conectadas a reagentes (R1, R2), amostra (A), reservatório de descarte (W), bobina

coletora (BC) e a coluna cromatográfica monolítica (CM). A coluna cromatográfica é geralmente precedida por uma pré-coluna (PC) e sucedida pelo sistema de detecção (D) (Idris, 2014).

Os sistemas SIC têm sido apontados como alternativa aos sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*) devido a comparável eficiência de separação aliada a uma série de vantagens e versatilidade. Com um sistema SIC, é possível realizar reações de derivatização em etapas pré ou pós-coluna. O consumo de reagentes e solventes, assim como a geração de resíduos, é menor devido ao fato do fluxo ser descontínuo. Graças ao seu reduzido tamanho, o SIC, ao contrário de sistemas HPLC, pode ser transportado e utilizado em campo. O custo associado a aquisição do sistema SIC é outra atrativa vantagem, seu valor é cerca de 2 a 3 vezes menor que o de um sistema HPLC. No entanto, deve-se mencionar que os sistemas SIC estão limitados a utilização de colunas que não geram muita pressão, como as monolíticas, além do fato de ainda não existir um bom *software* para o tratamento de dados obtidos com a técnica (Chocholouš et al., 2007).

Ao longo da última década e meia, há registrado na literatura diversos trabalhos em que sistemas SIC foram aplicados na análise de alimentos e bebidas (Batista et al., 2014; Chocholouš et al., 2017a; Chocholouš et al., 2017b; Jangbai et al., 2012), fluídos biológicos (Idris & Alnajjar, 2013; Šrámková, Chocholouš et al., 2015), monitoramento de bioprocessos (Rigobello-Masini & Masini, 2013), produtos farmacêuticos (Huclová et al., 2003; Idris & Elgorashe, 2014; Idris et al., 2011), análises ambientais (Batista et al., 2015; De Prá Urió & Masini, 2015; Horstkotte et al., 2015), entre outras possibilidades.

1.4. Estudos de adsorção-dessorção

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), adsorção é “um aumento na concentração de uma substância dissolvida na interface de uma fase líquida ou condensada devido a ação de forças de superfície” (IUPAC, 2014), ou seja, processos de adsorção são fenômenos onde ocorre a adesão de átomos, íons ou moléculas a uma superfície. A dessorção descreve o fenômeno oposto a adsorção, isto é, a liberação de uma substância que estava previamente imobilizada na superfície de um adsorvente.

A adsorção em sólidos é classificada em fisissorção (adsorção física) ou quimissorção (adsorção química). Em fisissorção, as espécies de interesse ficam aderidas a superfície do sólido por forças intermoleculares de van der Waals. Já em quimissorção, uma reação química ocorre na superfície do sólido, e a espécie de interesse é retida por ligações químicas (Levine, 2009).

Área superficial, propriedades físico-químicas do adsorvente e adsorvato, temperatura do sistema, natureza dos solventes utilizados e pH do meio são fatores que são comumente listados como influenciadores do processo de adsorção (Nascimento et al., 2014).

Estudos de adsorção-dessorção são úteis para a obtenção de informações relativas a mobilidade de espécies químicas e sua distribuição em diferentes sistemas como solo e água. Eles podem ser utilizados em estimativas da disponibilidade da espécie para degradação, incorporação por organismos, lixiviação em diferentes solos, entre outras (OECD, 2000).

A fim de se obter um bom modelo que descreva a mobilidade de espécies químicas, é essencial se estabelecer uma apropriada correlação para o equilíbrio de adsorção. Essas correlações de equilíbrio, conhecidas como isothermas de adsorção, descrevem graficamente o fenômeno de retenção (ou liberação) de uma substância de um meio aquoso, ou de ambientes aquáticos, na superfície de uma fase sólida a temperatura constante e pH controlado. O equilíbrio de adsorção é estabelecido após a fase contendo o adsorvato ficar em contato com o adsorvente por tempo suficiente para que a concentração do adsorvato no seio da solução entre em equilíbrio com a concentração do mesmo na interface. A isoterma de adsorção é obtida com o ajuste dos dados experimentais a uma curva de capacidade de adsorção (quantidade de adsorvato retido pela massa de adsorvente) pela concentração residual do adsorvato em solução após o tempo de contato (Foo & Hameed, 2010; Nascimento et al., 2014).

Ao longo dos anos, diversos modelos de isothermas de adsorção foram formulados. Dentre estes, os dois mais conhecidos e empregados são os de Langmuir e Freundlich.

1.4.1. Modelo de Langmuir

Em 1918, Irving Langmuir propôs um modelo para descrever a adsorção de gases em diferentes superfícies planas de sólidos. No modelo, é assumido que a superfície sólida é uniforme, as moléculas adsorvidas não interagem entre si, as moléculas adsorvidas se ligam em sítios específicos (todos os sítios apresentam igual afinidade pelo adsorvato), não há transmigração do adsorvato no plano da superfície e

a adsorção ocorre em monocamada e é homogênea (Foo & Hameed, 2010; Levine, 2009).

Graficamente, o equilíbrio é caracterizado pela presença de um *plateau* devido a saturação dos sítios de ligação: uma vez que uma molécula ocupa um sítio, outra molécula não pode se ligar ao mesmo sítio. A expressão matemática que representa o modelo de Langmuir é apresentada pela Equação 1.

$$q_e = \frac{q_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (1)$$

Onde q_e é a quantidade de soluto adsorvido por massa de adsorvente no equilíbrio; $q_{\max}$ é a capacidade máxima de adsorção; K_L é constante de interação adsorvato/adsorvente; e C_e concentração do adsorvato no equilíbrio (ou tempo de contato).

1.4.2. Modelo de Freundlich

O modelo de Freundlich foi o primeiro a tentar descrever um processo de adsorção não-ideal e reversível que não é restrito a formação de uma monocamada. O modelo pode ser aplicado a adsorção em multicamada, com uma distribuição energética não-uniforme e afinidade pela superfície heterogênea. Diferentemente do modelo de Langmuir, os sítios não são energeticamente equivalentes, o que faz com que alguns sítios sejam ocupados preferencialmente (Foo & Hameed, 2010). A Equação 2 descreve o modelo.

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (2)$$

Onde q_e é a quantidade de soluto adsorvido por massa de adsorvente no equilíbrio; K_F é a constante de capacidade de adsorção de Freundlich; C_e é a concentração do adsorvato no equilíbrio (ou tempo de contato); e $1/n$ é uma constante relacionada a heterogeneidade da superfície.

Isotermas de Freundlich são amplamente utilizadas no estudo de sistemas heterogêneos para compostos orgânicos e espécies altamente interativas. Em geral, quanto menor o valor do termo $1/n$, mais forte será a interação entre adsorvato e adsorvente. No entanto, $1/n$ se aproximando de 1 indica a ocorrência de adsorção linear (energias dos sítios de adsorção são idênticas).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A ampla utilização do GLYPH na agricultura moderna e a crescente preocupação com seu efeito sobre o meio ambiente em longo prazo têm levado grupos em todo mundo a ter o GLYPH como objeto de estudo. Para viabilizar a pesquisa com o GLYPH, métodos de análise simples e sensíveis são necessários para a determinação do herbicida em amostras de água, plantas e solo. Numerosas técnicas analíticas utilizadas na quantificação do GLYPH têm se mostrado confiáveis e, suficientemente, sensíveis para a maioria das aplicações. Contudo, muitos destes métodos se mostram proibitivos por motivos como custo de operação, tempo de análise ou tediosas etapas de pré-tratamento. Um elevado número de publicações buscando a revisão destas metodologias vindo sendo registrado com menções a variações em sistemas de extração, técnicas de separação e detecção em diferentes matrizes (Marek & Koskinen, 2014).

Explorando vantagens como baixo custo instrumental e operacional, portabilidade e baixa geração de resíduos, um método para determinação de GLYPH e AMPA em amostras de água e extrato de solo explorando a utilização de colunas monolíticas foi proposto (Colombo & Masini, 2014) e é aqui modificado para a realização de estudos de adsorção-dessorção do GLYPH em diferentes solos.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos e acessórios

Um cromatógrafo SiChrom™ obtido da FIALab Instruments (Bellevue, WA, EUA) foi utilizado. Os movimentos da bomba de seringa e válvula seletora puderam ser sincronizados pelo *software* FIALab 5.0. A detecção por fluorescência foi realizada com o espectrofluorímetro LC 1250 obtido da GBC Scientific Equipment (Dingley, VIC, Austrália) conectado a um computador pelo dispositivo multifuncional NI USB-6009 da National Instruments (Austin, TX, EUA) com a aquisição de dados realizada por um *software* criado com o LabVIEW 8.0.

Separações cromatográficas foram realizadas com uma coluna monolítica C₁₈ Onyx™ de 25 x 4,6 mm da Phenomenex (Torrance, Califórnia, EUA).

O aquecimento da mistura pré-coluna foi realizado pelo digestor/termoreator MA 4004 adquirido da Marconi (Piracicaba, SP, Brasil).

Para medir a massa de reagentes e amostras, foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo AB135-S FACT (Greifensee, Suíça) com precisão de até 0,00001 g.

Um pHmetro da Metrohm modelo 654 (Zofingen, Suíça) foi utilizado para a preparação de tampões e verificação de pH de amostras.

Para a centrifugação de amostras, uma centrífuga Thermo Fisher Scientific Sorvall ST 16R (Langenselbold, Alemanha) foi empregada.

Para os estudos de adsorção-dessorção, uma incubadora refrigerada do tipo *shaker* adquirida da Marconi (Piracicaba, SP, Brasil) foi utilizada.

3.2. Reagentes e Soluções

A água utilizada no preparo das soluções foi submetida a tratamento com um sistema de purificação de água osmose reversa da Gehaka OS10LXE (São Paulo, SP, Brasil) e deionizada a 18,2 MΩ cm por um sistema Simplicity 185 da Millipore (Billerica, MA, USA) equipado com lâmpada UV.

N-(fosfonometil)glicina grau analítico Pestanal® (GLYPH), ácido aminometilfosfônico (AMPA), glicina (GLY), K₂HPO₄, KH₂PO₄, o-ftaldialdeído, Ca(ClO)₂, H₃BO₃ e 2-mercaptoetanol de grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Metanol (MeOH) de grau HPLC foi fornecido pela J. T. Baker (Ecatepec de Morales, Edomex, México).

Com base no método 547 da US EPA, os reagentes foram preparados com algumas modificações: Reagente 1 (ClO⁻) foi preparado dissolvendo 15 mg de Ca(ClO)₂ em 500 mL em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ em pH 6,8. Reagente 2 (OPA-ME) foi preparado dissolvendo 15 mg de o-ftaldialdeído (OPA) em 1 mL de metanol e 25 µL de 2-mercaptoetanol (ME), completando o volume com tampão borato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,5). Esta solução foi protegida da exposição a luz sendo estocada em frascos âmbar sob atmosfera de nitrogênio em temperaturas inferiores a 4°C por até uma semana sem que ocorressem depreciações significativas na fluorescência das espécies geradas no processo de derivatização.

Fases móveis foram preparadas em duas diferentes composições: 15 : 85 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8) (fase móvel 1) e 50 : 50 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (fase móvel 2). O tampão foi filtrado com membranas de

acetato de celulose de 0,22 μm da Allcrom (São Paulo, SP, Brasil). Após a adição da fase orgânica, gases foram removidos por sonificação por 30 minutos.

Roundup Original DI ®, uma das formulações comerciais do GLYPH, produzido pela Monsanto Company (São José dos Campos, SP, Brasil) foi adquirido para os experimentos de adsorção.

3.3. Amostras

3.3.1. Amostras de água

Amostras de água foram coletadas com um recipiente de polipropileno de diferentes localidades dentro do município de Guarulhos na Grande São Paulo: de um lago dentro do parque Bosque Maia e de um lago no ponto de lazer Lago dos Patos.

3.3.2. Amostras de solo

Amostras de solo foram coletadas de diferentes localidades dentro do município de Londrina no estado do Paraná e fornecidas pelo Prof. Dr. Gilberto Abate do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. A amostragem, o tratamento e a caracterização do solo foram descritas por Hanke e colaboradores (Hanke et al., 2015). A Tabela 2 resume as características dos solos coletados.

Tabela 2: Características dos solos utilizados

Solos	Horizonte	Argila (%)	Silte (%)	Areia (%)	TOC (g kg ⁻¹)	CTC cmol dm ⁻³
Latossolo	B	83,1	12,2	4,7	8,2	1,5
Chernossolo	A	43,9	43,4	12,6	34,3	27,1
	B	65,5	22,8	11,7	13,4	19,2

Fonte: (Hanke et al., 2015)

Todas as amostras de solo foram peneiradas, sendo que apenas frações com tamanho de partícula de até 300 µm foram utilizadas nos estudos.

3.4. Procedimentos

3.4.1. Análise do GLYPH e AMPA com o SIC

O programa utilizado na determinação do GLYPH e AMPA é descrito na Tabela 3. Numeração e siglas estão em concordância com o esquema do instrumento ilustrado pela Figura 7.

Figura 7: Configuração do sistema SIC utilizado para a separação cromatográfica do AMPA e GLYPH. FM₁ = Fase Móvel 1 (15 : 85 MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 6,8); FM₂ = Fase Móvel 2 (50 : 50 MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 6,8), BS = bomba de seringa (capacidade de 4 mL), VA = válvula de alívio, BC = bobina coletora, VR = válvula rotatória com (5000 psi), OPA-ME = 150 mg L⁻¹ em tampão borato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,5), Ca(ClO)₂ = 30 mg L⁻¹ em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8), PC = pré-coluna C₁₈ 5 x 4,6 mm, CM = coluna monolítica C₁₈ 25 x 4,6 mm, D = detector de fluorescência.

Entre as etapas 1 e 3, a bomba de seringa e linha de amostragem são preenchidas com a fase móvel 1, enquanto o tubo da porta 2 é preenchido com a amostra. Nas etapas 4 e 5, a zona reacional para a oxidação do GLYPH a GLY é formada com a aspiração de 400 µL da amostra e 400 µL de Ca(ClO)₂ em 4 porções (intercalando 80 µL de ClO⁻ com 80 µL da amostra). Esta estratégia é aplicada para que ocorra uma melhor interpenetração quando o fluxo é invertido para se dispensar o conteúdo na bobina auxiliar. Na etapa 6, mais 80 µL de ClO⁻ é adicionado para se completar a zona reacional com o reagente. O conteúdo é, então, enviado para a bobina auxiliar (etapa 7) com a posterior parada de fluxo por 15 segundos (etapa 8).

Parte da mistura reacional (400 μL) é transferida para a linha de amostragem (etapa 9) e é posteriormente descartada na porta 7 (etapa 10).

Entre as etapas 11 e 14, a derivatização da GLY (gerada a partir do GLYPH) e do AMPA ocorre com a adição intercalada de 40 μL de OPA-ME, 20 μL da amostra tratada com ClO^- , 40 μL de OPA-ME e 20 μL de amostra não tratada com o ClO^- . A necessidade de se aspirar a amostra não tratada advém do desaparecimento do sinal do AMPA quando apenas a amostra tratada é enviada para a reação com o OPA-ME. Para se fechar a zona de derivatização, 40 μL de OPA-ME é aspirado (etapa 15). Na etapa 16, a fase móvel é aspirada para completar o volume da bomba de seringa a 4000 μL .

Entre as etapas 17 e 21, o conteúdo presente na bobina de seringa foi enviada para a porta 8 passando pela coluna monolítica de C_{18} para separar outros componentes orgânicos presentes no solo e os produtos de derivatização gerados a partir do GLYPH e AMPA. A bomba de seringa é preenchida de forma a garantir que os picos saíam em apenas uma única etapa de eluição. Anteriormente a última etapa de eluição (etapa 24), 3000 μL da fase móvel 1 e 200 μL da fase móvel 2 são aspirados, respectivamente, na bomba de seringa e na bobina coletora (etapas 22 e 23).

Tabela 3: Etapas para a análise sequencial do GLYPH e AMPA

Etapa	Porta de VR	Comando de VS e parâmetros	Ação
1	9	Aspirar 3000 μL a 150 $\mu\text{L s}^{-1}$	Preencher bomba com fase móvel 1

2	2	Aspirar 200 μL a 100 $\mu\text{L s}^{-1}$	Preencher a linha de amostragem com a amostra
3	7	Dispensar 500 μL a 200 $\mu\text{L s}^{-1}$	Descartar excesso de amostra que adentra a linha de amostragem
Começo do loop – 5 repetições			
4	3	Aspirar 80 μL a 100 $\mu\text{L s}^{-1}$	Formar zona reacional para a oxidar o GLYPH a GLY com o ClO^-
5	2	Aspirar 80 μL a 100 $\mu\text{L s}^{-1}$	
Final do loop			
6	3	Aspirar 80 μL a 100 $\mu\text{L s}^{-1}$	Fechar a zona reacional com ClO^-
7	4	Dispensar 880 μL a 100 $\mu\text{L s}^{-1}$	Enviar mistura reacional para a bobina auxiliar
8	-	-	Parada de fluxo por 15 s
9	4	Aspirar 400 μL a 100 $\mu\text{L s}^{-1}$	Enviar parte da mistura reacional para a linha de amostragem
10	7	Dispensar 500 μL a 100 $\mu\text{L s}^{-1}$	Descartar parte da mistura reacional
Começo do loop – 2 repetições			
11	5	Aspirar 40 μL a 20 $\mu\text{L s}^{-1}$	Derivatização da GLY gerada a partir do GLYPH e do AMPA com o OPA-ME (Aqui houve a aspiração intercalada da amostra/padrão tratado e não tratado com o
12	4	Aspirar 20 μL a 20 $\mu\text{L s}^{-1}$	
13	5	Aspirar 40 μL a 20 $\mu\text{L s}^{-1}$	
14	2	Aspirar 20 μL a 20 $\mu\text{L s}^{-1}$	

hipoclorito de cálcio)			
Final do loop			
15	5	Aspirar 40 μL a 20 $\mu\text{L s}^{-1}$	Fechar a zona de derivatização com o OPA-ME
16	9	Aspirar 20 μL a 20 $\mu\text{L s}^{-1}$	Completar o volume da bomba de seringa para 4000 μL com fase móvel 1
17	8	Dispensar 2500 μL a 25 $\mu\text{L s}^{-1}$	Primeira etapa da eluição de produtos fluorescentes
18	9	Aspirar 2600 μL a 150 $\mu\text{L s}^{-1}$	Preencher bomba de seringa com fase móvel 1
19	8	Dispensar 3000 μL a 25 $\mu\text{L s}^{-1}$	Segunda etapa de eluição de produtos fluorescentes
20	9	Aspirar 4000 μL a 150 $\mu\text{L s}^{-1}$	Preencher bomba de seringa com fase móvel 1
21	8	Dispensar 4000 μL a 25 $\mu\text{L s}^{-1}$	Terceira etapa de eluição de produtos fluorescentes
22	9	Aspirar 3000 μL a 150 $\mu\text{L s}^{-1}$	Preencher bomba de seringa com fase móvel 1
23	6	Aspirar 200 μL a 150 $\mu\text{L s}^{-1}$	Aspirar fase móvel 2 para a bobina coletora
24	8	Dispensar 3200 μL a 25 $\mu\text{L s}^{-1}$	Última etapa de eluição de produtos fluorescentes

3.4.2. Estudo de adsorção-dessorção

Para se determinar o tempo de contato a ser utilizado nos estudos de adsorção-dessorção, um estudo cinético de adsorção foi realizado.

Tubos de centrifugação de capacidade de 15 mL (tipo Corning ®) foram utilizados para conter o sistema adsorvato-adsorvente: massa fixa de solo (30 ou 60 mg), o adsorvente, foi adicionada a uma solução aquosa de 10,0 mL de KCl 20 mmol L⁻¹ com concentração fixa de 40 µmol L⁻¹ de GLYPH em formulação comercial (Roundup Original DI ®), o adsorvato. Além dos sistemas adsorvato-adsorvente, brancos puderam ser registrados com a adição de quantidade fixa de solo a solução de 10,0 mL de KCl 20 mmol L⁻¹. Sistemas controles foram monitorados com uma solução de 10,0 mL de KCl 20 mmol L⁻¹ com concentração fixa de 40 µmol L⁻¹ de GLYPH em formulação comercial sem o acréscimo de solo.

Os tempos de contato testados em duplicatas foram de 0,5; 1; 2; 4; 8; 24; e 48 horas.

Inicialmente, os tubos foram colocados em uma incubadora refrigerada do tipo *shaker* em temperatura constante de 25 ± 0,5 °C com agitação de 250 rpm. Após o tempo de incubação, as suspensões foram centrifugadas a 4000 X *g* por 15 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram filtrados com membranas de acetato de celulose de 0,45 µm e analisados com o SIC.

Determinado o tempo de contato, o estudo de adsorção foi realizado. Assim como no estudo cinético, uma quantidade fixa de solo (30 ou 60 mg) foi adicionada a uma solução de 10,0 mL de KCl 20 mmol L⁻¹ com concentração variável de GLYPH em formulação comercial. As concentrações utilizadas foram de 10; 20; 40; 80; 160; 320; 480; e 640 µmol L⁻¹.

Os tubos foram colocados na incubadora refrigerada a $25 \pm 0,5$ °C com agitação de 250 rpm. Posteriormente, as suspensões foram centrifugas e filtradas assim como o mencionado para o estudo cinético.

Para a avaliação da dessorção, trocou-se 9,0 mL da solução utilizada no estudo de adsorção por 9,0 mL de solução de KCl 20 mmol L⁻¹. Os sistemas testados foram incubados a temperatura de $25 \pm 0,5$ °C com agitação de 250 rpm, centrifugados, filtrados e o analisados pelo sistema SIC.

Para a correção dos efeitos decorrentes da matriz, curvas analíticas foram construídas usando soluções que foram preparadas na própria matriz insenta dos analitos. Para o preparado dos padrões na solução matriz, massas de solo de 30 ou 60 mg foram colocadas em solução aquosa de KCl 20 mmol L⁻¹ e os sistemas foram agitados a 250 rpm por tempo de contato determinado a $25 \pm 0,5$ °C. Após a agitação, as suspensões foram centrifugas e filtradas conforme o descrito para o estudo de adsorção. Volumes de 9,0 mL do extrato do solo foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, o volume foi completado com quantidades apropriadas de água deionizada e solução preparada com o GLYPH para gerar padrões com concentrações de 0; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 e 12,8 µmol L⁻¹.

3.4.3. Tratamento de dados

Dados referentes aos estudos de adsorção-dessorção foram tratados com a aplicação dos modelos, discutidos anteriormente, Freundlich e Langmuir. Os ajustes

aos modelos foram realizados e a obtenção dos parâmetros referentes a cada modelo foram possíveis com a utilização do software Origin 8.5 (Northampton, MA, EUA).

4. RESULTADOS E DICUSSÃO

4.1. Reações envolvidas

A determinação do GLYPH e AMPA pode ser dividida em duas partes: (a) conversão do GLYPH a GLY com o ClO^- e (b) a formação dos produtos fluorescentes por derivatização com o OPA-ME. A necessidade de se converter o GLYPH a GLY advém do fato do mesmo ser uma amina secundária, o que impede a formação do indol na presença do OPA-ME. Além disso, a derivatização forma derivados mais apolares, tornando possível a utilização de cromatografia líquida em fase reversa. As reações de conversão e derivatização podem ser conferidas na Figura 8.

Figura 8: Reações utilizadas. (a) Conversão do GLYPH a GLY (b) Formação de produtos fluorescentes a partir da GLY e AMPA

4.2. Otimização de parâmetros

Para se chegar a um método que permita tanto a análise de amostras de água quanto de solo de forma simples e rápida, algumas melhorias foram propostas e testadas no método anteriormente publicado pelo grupo (Colombo & Masini, 2014):

- Realização da análise em uma única corrida cromatográfica;
- Eliminação do aquecimento na etapa de conversão do GLYPH a GLY;
- Diminuição do tempo de análise com a modificação da composição da fase móvel utilizada;
- Verificação de composição de fase móvel que permita a aplicação do método a amostras de solo;

4.2.1. Corrida cromatográfica

No trabalho anteriormente proposto, a determinação do GLYPH e AMPA era feita em duas etapas. Em um primeiro momento, uma alíquota da amostra era tratada com o ClO^- , enquanto uma outra alíquota era enviada para reagir com o OPA-ME para se formar um dos produtos fluorescentes e, posteriormente, seguir para a coluna cromatográfica e detector. Em uma segunda etapa, a alíquota que foi tratada com o ClO^- era derivatizada com o OPA-ME e enviada para a coluna. A necessidade de se realizar a separação em duas etapas advinha do não aparecimento de um pico referente ao produto fluorescente gerado a partir do AMPA. Uma possível explicação

para isso seria a formação de uma cloroamina a partir do AMPA, uma amina primária, e o hipoclorito (Hammerl & Klapötke, 2011).

Com o intuito de se realizar uma única corrida, diversas estratégias foram testadas. Por fim, adotou-se uma em que se acrescenta solução que não foi tratada com o ClO^- a solução tratada e OPA-ME. A estratégia permite que tanto os produtos fluorescentes provenientes do GLYPH quanto do AMPA sejam formados. A Figura 9 ilustra cromatogramas em que a determinação com e sem a mistura das duas soluções foram realizadas. Observa-se a ausência do pico referente ao produto fluorescente derivado do AMPA no sistema sem a adição da alíquota não tratada com ClO^- .

Figura 9: Cromatogramas: (a) sistema onde não ocorre a adição de solução não-tratada com ClO^- . (b) sistema onde ocorre a adição de solução não-tratada com ClO^- . (1) Produto fluorescente derivado do AMPA. (2) Produto derivado do GLYPH. Atribuição de picos: 1 = AMPA; 2 = GLYPH. Condições da análise: Volume amostrado: 200 μL ; Concentração de AMPA e GLYPH: 3,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Fase móvel: 30 : 70 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,8); Vazão da etapa de eluição: 25 $\mu\text{L s}^{-1}$; Detecção: $\lambda_{\text{excitação}} = 334 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 440 \text{ nm}$

4.2.2. Aquecimento

Outra otimização proposta foi a eliminação da etapa de aquecimento no momento de conversão do GLYPH a GLY. Esta eliminação tornaria a configuração do sistema mais simples e tornaria a corrida cromatográfica mais curta. Contudo, observou-se um sinal de menor intensidade correspondente ao produto derivado do GLYPH. Portanto, a etapa de aquecimento foi mantida. Cromatogramas ilustrando a diferença na intensidade do pico do produto fluorescente proveniente do GLYPH são observados na Figura 10.

Figura 10: Cromatogramas: (a) sistema não aquecido. (b) sistema aquecido a 48°C. (1) Produto fluorescente derivado do AMPA. (2) Produto derivado do GLYPH. Atribuição de picos: 1 = AMPA; 2 = GLYPH. Condições da análise: Volume amostrado: 200 μL ; Concentração de AMPA e GLYPH: 3,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Fase móvel: 30 : 70 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,8); Vazão da etapa de eluição: 25 $\mu\text{L s}^{-1}$; Detecção: $\lambda_{\text{excitação}} = 334 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 440 \text{ nm}$

4.2.3. Fase móvel

Com o intuito de se diminuir o tempo da corrida cromatográfica, diferentes composições de fase móvel foram testadas. Sabe-se que o fator de retenção de uma espécie perante a coluna cromatográfica depende do quão forte a mesma interage com

a fase estacionária e com os solventes que compõem a fase móvel. Portanto, em fase reversa, quanto maior for a fração contendo solvente mais apolar, menos a espécie de interesse irá interagir com o material apolar da fase estacionária.

Em um primeiro momento, uma fase móvel composta por 30% em volume de metanol e 70% de solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH = 6,8) foi testada com solução contendo GLYPH e AMPA 0,80 µmol L⁻¹ em água destilada. Observou-se que os picos correspondentes aos produtos fluorescentes derivados do GLYPH e AMPA foram satisfatoriamente separados [Figura 11 (a)]. Contudo, quando a mesma composição de fase móvel foi aplicada na separação dos padrões em extrato de solo (obtido pelo contato por 24 horas entre solo e água, simulando condições do estudo de adsorção), notou-se a sobreposição de um novo pico com o referente ao derivado do AMPA. Acredita-se que este novo pico é referente ao conteúdo orgânico presente no solo, e que contém compostos que apresentam propriedades fluorescentes como ácidos fúlvicos [Figura 11 (b)].

Figura 11: Cromatogramas: (a) análise em água com fase móvel 30 : 70 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8), (b) análise em extrato aquoso de solo com fase móvel 30 : 70 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8) e (c) análise em extrato aquoso de solo com fase móvel 15 : 85 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8). Atribuição de picos: 1 = AMPA; 2 = GLYPH; 3 = conteúdo orgânico presente no extrato de solo. Condições da análise: Volume amostrado: 200 µL; Concentração de AMPA e GLYPH: 0,8 µmol L⁻¹; Vazão da etapa de eluição: 25 µL s⁻¹; Detecção: $\lambda_{\text{excitação}} = 334 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 440 \text{ nm}$

Em uma última etapa, testou-se uma fase móvel com 15% de metanol com 85% de solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH = 6,8) com o extrato de solo [Figura 11 (c)]. Aqui, a separação dos analitos e da matriz se deu efetivamente ao custo de significativo aumento no tempo de análise.

4.3. Validação do método

4.3.1. Confirmação de picos e parâmetros cromatográficos

A título de confirmação das espécies formadas a partir do GLYPH e AMPA, soluções-padrão contendo apenas GLYPH e apenas AMPA foram injetadas e seus sinais comparados com os sinais obtidos na separação. Também foi realizada uma comparação entre os sinais correspondentes ao GLYPH (que foi convertido a GLY) e ao da própria GLY. Os cromatogramas referentes a estes ensaios são apresentados na Figura 12.

Figura 12: Cromatogramas de (a) comparação entre derivado de AMPA e separação de derivados AMPA e GLYPH, (c) comparação entre derivado de GLYPH e separação de derivados de AMPA e GLYPH, (a)

separação de derivados de AMPA e GLYPH e (d) comparação entre derivados de GLYPH e GLY. Condições da análise: Volume amostrado: 200 μL ; Concentração de AMPA e GLYPH: 3,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Fase móvel: 15 : 85 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,8); Vazão da etapa de eluição: 25 $\mu\text{L s}^{-1}$; Detecção: $\lambda_{\text{excitação}} = 334 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 440 \text{ nm}$

Comparando-se as áreas dos picos correspondendo aos derivados de GLYPH e GLY, observa-se que o pico correspondente ao GLYPH equivale a 41,3% do pico observado para a GLY na mesma concentração. Deve-se mencionar que não podemos fazer uma correlação direta entre taxa de conversão e as áreas de picos referentes ao GLYPH e GLY, uma vez que houve a aspiração de solução não convertida em GLY e, portanto, nem todo o GLYPH amostrado pode ser convertido no produto fluorescente detectado.

A partir de cromatogramas registrados com apenas AMPA, apenas GLYPH e uma mistura de AMPA e GLYPH, calculou-se a resolução de 4,40 entre os dois picos (considerando metade da altura). A Tabela 4 sumariza os parâmetros cromatográficos como tempo de retenção (t_R), fator de assimetria, número de pratos, número de pratos por m de coluna e altura de prato obtidos para o método anteriormente desenvolvido e para o método aqui desenvolvido.

Tabela 4: Comparação de parâmetros cromatográficos para os dois métodos para a análise de GLYPH e AMPA

Método	Espécie	t_R (s) ^a	Fator de assimetria	Número de Pratos ^b	Pratos por m ^c	Altura de prato (μm) ^c
Anterior	AMPA	58 $\pm$ 1	2	137	5480	182
	GLYPH	114 $\pm$ 3	1,8	375	14987	67
Atual	AMPA	278 $\pm$ 2	2,2	1855	74200	13
	GLYPH	413 $\pm$ 5	1,9	2171	86840	11

^a Estimado descontando-se os passos de amostragem e derivatização da análise por SIC ^b Computado de acordo com a equação de Foley-Dorsey para picos com comportamento não gaussiano (Foley & Dorsey, 1983) ^c Calculado considerando-se o tamanho da coluna de 2,5 cm.

Com menor proporção de metanol utilizado, 15 : 85 (v/v) MeOH : tampão fosfato contra 20 : 80 (v/v) MeOH : tampão fosfato do método anteriormente desenvolvido, e maiores tempos de retenção, nota-se que houve perdas em termos de tempo de análise. Por outro lado, não se observou o alargamento de picos e parâmetros relacionados a eficiência da separação, como a altura de prato teóricos, evidenciaram a melhor performance do método aqui proposto. Além disso, os valores de altura de prato obtidos para o método estão mais próximos do esperado para cromatografia líquida (cerca de 10 μm) (Skoog et al., 2014) do que o método desenvolvido anteriormente.

4.3.2. Estudos de interferência

Testes foram efetuados para se verificar a possibilidade de outros compostos comumente encontrados em amostras de água e solo interferirem na determinação do GLYPH e AMPA. Foram selecionados ácidos orgânicos presentes em ambas matrizes (ácido fúlvico e húmico) e ânions presentes no solo provenientes do metabolismo de organismos associados (citrato, oxalato) assim como herbicidas amplamente utilizados (atrazina, simazina, propazina e paraquat).

Em todos os testes, as concentrações de GLYPH e AMPA foram de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,84 mg L^{-1} para o GLYPH e 0,55 mg L^{-1} para o AMPA) e do interferente de 0,5 mg L^{-1} .

Os valores de concentração nominais e determinados, assim como seus respectivos erros relativos, estão sumarizados na Tabela 5.

Observa-se pelos valores de erro relativo que as espécies levantadas como possíveis interferentes não interferiram consideravelmente na determinação dos analitos. O oxalato foi o que mais alterou o valor determinado em comparação ao valor nominal de concentração. Para o AMPA o erro relativo foi de 2,33% enquanto para o GLYPH foi de -5,33%. Nota-se que para o AMPA, três dos possíveis interferentes geraram erros relativos negativos (citrato, ácido húmico e atrazina) enquanto que para o GLYPH, apenas o oxalato gerou um erro relativo negativo.

Tabela 5: Efeito de possíveis interferentes na determinação do GLYPH e AMPA. Concentração nominal do GLYPH e AMPA de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Concentrações dos interferentes são de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Possível Interferente	Nominal para AMPA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Determinado para AMPA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Erro relativo (%)	Nominal para GLYPH ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Determinado para GLYPH ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Erro relativo (%)
-	5,0	5,31	-	5,0	5,01	-
Citrato	5,0	5,29	-0,31	5,0	5,15	2,76
Oxalato	5,0	5,43	2,33	5,0	4,74	-5,33
Ácido fúlvico	5,0	5,31	0,12	5,0	5,08	1,42
Ácido húmico	5,0	5,23	-1,15	5,0	5,08	1,38
Atrazina	5,0	5,29	-0,41	5,0	5,07	1,17
Propazina	5,0	5,38	1,27	5,0	5,15	2,90
Simazina	5,0	5,33	0,41	5,0	5,03	0,48
Paraquat	5,0	5,42	2,17	5,0	5,12	2,16

4.3.3. Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Considerando uma certa faixa de aplicação, a linearidade traz informações sobre a competência de um método em correlacionar um sinal medido e a concentração de uma substância investigada (Ribani et al., 2004). Essa correlação é demonstrada através de curvas analíticas registradas nas concentrações de 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; e 12,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o AMPA e 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; e 12,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o GLYPH (Figura 13).

Figura 13: Sinais relativos de fluorescência para soluções padrões com AMPA e GLYPH em diferentes concentrações. Sinais relativos de fluorescência para soluções padrões com AMPA e GLYPH em diferentes concentrações. Atribuição de picos: 1 = AMPA; 2 = GLYPH. Condições da análise: Volume amostrado: 200 μL ; Fase móvel: 15 : 85 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,8); Vazão da etapa de eluição: 25 $\mu\text{L s}^{-1}$; Detecção: $\lambda_{\text{excitação}} = 334 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 440 \text{ nm}$

Curvas de calibração registradas para o AMPA e GLYPH apresentaram comportamento linear para concentrações de 0,4 a 12,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o AMPA e 0,4 a 12,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o GLYPH com curvas $Y = (0,020 \pm 0,001) C_{\text{AMPA}} - (0,004 \pm 0,001)$ com R^2 de 0,995 e $Y = (0,014 \pm 0,002) C_{\text{GLYPH}} + (0,003 \pm 0,001)$ com R^2 de 0,999, onde Y é a área do pico obtido e C_{AMPA} a concentração de AMPA e C_{GLYPH} a concentração de GLYPH. Valores de limite de detecção e quantificação foram obtidos a partir das expressões $LD = 3S_d/m$ e $LQ = 10S_d/m$, respectivamente, onde S_d é o desvio padrão das áreas dos sinais obtidos para 7 medidas do padrão de concentração de 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e m coeficiente angular da equação de reta para a calibração realizada. LD e LQ para o AMPA foram, respectivamente, de 0,07 e 0,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (7,8 e 24 $\mu\text{g L}^{-1}$). Para o GLYPH, LD e LQ foram de 0,10 e 0,33 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (17 e 56 $\mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. Estes valores assim como as informações mencionadas anteriormente encontram-se sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6: Desempenho do método cromatográfico por injeção sequencial

	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Coeficiente angular ^a	Coeficiente linear ^a	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
AMPA	0,4 – 12,8	$0,020 \pm 0,001$	$-0,004 \pm 0,001$	0,07	0,22
GLYPH	0,4 – 12,8	$0,014 \pm 0,002$	$0,003 \pm 0,001$	0,10	0,33

^a R^2 médio de 0,995 para o AMPA e 0,999 para o GLYPH

Para se verificar a estabilidade do reagente OPA-ME, curvas de calibração foram construídas em dias consecutivos com o reagente que foi preparado no dia anterior (Figura 14). Os coeficientes angulares médios obtidos foram de $0,014 \pm 0,002$ e $0,020 \pm$

0,001 para o GLYPH e AMPA, respectivamente. Com valores de desvio padrão relativo (DPR) de 15,6 e 3,1% para os coeficientes angulares das curvas para o GLYPH e AMPA, respectivamente, a construção de uma calibração por semana é suficiente para a realização de triagem de amostras. Recomenda-se, no entanto, que curvas analíticas sejam registradas todos os dias para estudos que exigem maior exatidão.

Figura 14: Curvas analíticas obtidas em 3 dias seguidos para AMPA e GLYPH. Condições da análise: Volume amostrado: 200 μL ; Fase móvel: 15 : 85 (v/v) MeOH : tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,8); Vazão da etapa de eluição: 25 $\mu\text{L s}^{-1}$; Detecção: $\lambda_{\text{excitação}} = 334 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 440 \text{ nm}$

Comparando-se ao método proposto pela US EPA (US EPA, 1990), que utiliza as mesmas reações, o método aqui relatado se mostrou capaz de realizar mais análises por unidade de tempo: 4,6 análises por hora contra cerca de 3 análises por hora para o método da agência ambiental americana. Adicionalmente, o método SIC gerou uma menor quantidade de resíduos. Em uma análise, o método consome 12 μg de hipoclorito de cálcio, 24 μg de *o*-dialftaldeído, 45 μg de 2-mercaptoetanol contra 98 μg de hipoclorito de cálcio, 650 μg de *o*-dialftaldeído e 360 μg 2-mercaptoetanol (considerando uma corrida com vazão de 0,5 mL min^{-1} e tempo de retenção para o glifosato de 13 min). Apenas a quantidade de metanol utilizado na fase móvel sofreu um

acréscimo, de 0,26 mL para 2,6 mL. Já comparado ao método proposto anteriormente, o atual método consome mais reagentes, contudo utiliza uma fase móvel com menor concentração de metanol.

4.3.4. Avaliação de precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios realizados de forma independente, podendo ser repetidos de uma mesma amostra, amostras com composições semelhantes ou padrões (Ribani et al., 2004). É considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Como o processo de validação em questão se deu em apenas um único laboratório (*in-house method validation*), apenas repetitividade e precisão intermediária foram avaliadas seguindo os critérios mínimos preconizados pelo INMETRO (INMETRO, 2010).

Nos testes de repetitividade, 3 concentrações foram avaliadas em 7 repetições através da estimativa do DPR para o sinal analítico obtido. Já para a precisão intermediária, as mesmas concentrações foram avaliadas em dois dias diferentes com 7 repetições para cada concentração em cada dia. Os valores de desvio padrão relativo das medidas estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7: Avaliação de precisão: testes de repetitividade e precisão intermediária em 3 concentrações diferentes para AMPA e GLYPH

		Repetitividade	Precisão Intermediária
	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$ / ppm)	DPR (%)	DPR (%)
AMPA	0,8 / 0,09	2,9	3,8

GLYPH	2,8 / 0,31	2,7	2,8
	6,4 / 0,71	0,9	4,5
	0,8 / 0,13	2,8	5,8
	2,8 / 0,47	4,4	6,1
	6,4 / 1,1	1,2	6,0

É observado que os valores de DPR estão de acordo com o que é considerado satisfatório para um método que pretende analisar espécies em nível de traços (100 ppm a 1 ppb), ou seja, DPR de até 20% (Ribani et al., 2004).

4.3.5. Avaliação de exatidão

A avaliação de exatidão de método visa investigar a concordância entre resultados obtidos através deste método com o de um valor tido como verdadeiro (Ribani et al., 2004).

Para os estudos de exatidão, foram utilizados ensaios de recuperação. A recuperação foi estimada com a fortificação de amostras (água de lago e extrato de solo) com quantidades conhecidas do AMPA e GLYPH em três concentrações e posteriormente comparada com o valor determinado através da curva de calibração obtido em água deionizada. Os valores de recuperação estão reunidos na Tabela 8.

Tabela 8: Ensaios de recuperação em diferentes matrizes para AMPA e GLYPH em 3 níveis de concentração

Matriz	Concentração adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)	
		AMPA	GLYPH

Água de lago	0,8	151,5	113,5
	2,8	121,0	120,4
	6,4	108,4	113,5
Extrato de solo	0,8	102,5	140,5
	2,8	110,4	87,3
	6,4	97,2	74,6

Para concentrações acima de $2,8 \mu\text{mol L}^{-1}$, observa-se valores de recuperação entre 74,6 (GLYPH) e 121,0% (AMPA), o que indica que o método pode ser satisfatoriamente aplicado em processos de triagem de amostras para estes níveis de concentração. Entretanto, para concentrações de AMPA e GLYPH de $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ (ou menores), recuperações de 151,5% foram observadas para o AMPA (água de lago) e de 140,5% para GLYPH (extrato de solo), indicando que para estes casos, tratamento de amostra com extração em fase sólida seria desejável, pois os resultados sugerem que componentes fluorescentes da matriz da amostra podem causar erros significativos nos resultados.

4.4. Determinação do glifosato em amostras de água

As amostras de água coletadas foram fortificadas com AMPA e GLYPH em três diferentes níveis ($0,8$; $2,8$; e $6,4 \mu\text{mol L}^{-1}$) e posteriormente analisadas com o método proposto em triplicatas. Os resultados obtidos estão reunidos na Tabela 9. Na maior parte dos casos, observa-se que os valores de recuperação estão dentro do que é considerado aceitável para métodos que visam determinar espécies em nível de traços

(70 a 120%), indicando, portanto, a eficácia do método na quantificação dos analitos. Ainda assim, para valores de concentração $< 0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$, especialmente para AMPA, desvios positivos podem ser encontrados, sendo desejável uma etapa de *clean-up* da amostra antes da separação cromatográfica.

Tabela 9: Determinação de AMPA e GLYPH em amostras de água em três níveis de concentração

Amostra	Espécie	Concentração nominal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração determinada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	DPR (%)	Recuperação (%)
Bosque Maia	AMPA	0,8	$1,2 \pm 0,2$	16,7	145,7
		2,8	$3,5 \pm 0,1$	2,8	123,5
		6,4	$6,9 \pm 0,1$	1,5	108,4
	GLYPH	0,8	$0,9 \pm 0,1$	11,1	113,5
		2,8	$3,4 \pm 0,1$	2,1	120,4
		6,4	$7,2 \pm 0,3$	3,5	113,5
Lago dos Patos	AMPA	0,8	$0,9 \pm 0,1$	1,2	109,5
		2,8	$3,4 \pm 0,1$	2,3	120,4
		6,4	$6,9 \pm 0,1$	2,0	108,0
	GLYPH	0,8	$0,9 \pm 0,1$	15,3	110,1
		2,8	$3,0 \pm 0,1$	2,3	107,8
		6,4	$5,8 \pm 0,1$	1,0	90,4

4.5. Determinação do glifosato em formulação comercial

Uma formulação comercial foi analisada com o método proposto. A formulação analisada foi o Roundup DI ® da Monsanto. Segundo o fabricante, a mesma apresenta

445 g L⁻¹ (44,5% m/v) do sal de di-amônio de N-(fosfonometil) glicina (GLYPH), o que equivale a 370 g L⁻¹ (37,0% m/v) de N-(fosfonometil) glicina (GLYPH) em sua forma ácida. Sabendo-se que a massa molar do equivalente ácido do GLYPH é de 169,07 g mol⁻¹, sua concentração molar é de 2,19 mol L⁻¹.

Inicialmente, uma alíquota do herbicida foi diluída até a concentração de 1 mmol L⁻¹ e posteriormente diluída novamente para as concentrações de 2,5 µmol L⁻¹ e 5,0 µmol L⁻¹, as quais se encontram na faixa linear do método. As medidas foram realizadas em triplicatas. Os resultados estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10: Determinação de GLYPH em formulação comercial em dois níveis

Concentração nominal (µmol L ⁻¹)	Concentração determinada (µmol L ⁻¹)	DPR (%)	Recuperação (%)
2,5	2,4 ± 0,1	4,2	94,3
5,0	5,2 ± 0,1	1,9	104,3

4.6. Estudos de adsorção-dessorção

4.6.1. Cinética de adsorção

O estudo da cinética de adsorção na interface sólido-solução é de grande utilidade devido à possibilidade de se obter informações sobre a taxa com que a sorção ocorre, assim como se estabelecer o tempo de contato mínimo requerido para que a adsorção ocorra em extensão considerada satisfatória.

O efeito do tempo de contato na adsorção do GLYPH pelas soluções contendo as amostras de solo pode ser conferido na Figura 15. Observa-se que a quantidade de GLYPH adsorvido aumenta até 24 horas e depois se mantém relativamente constante para todos os solos avaliados. Portanto, 24 horas foi selecionado como tempo de contato adequado para os estudos. A variação na quantidade de GLYPH adsorvido para as diferentes amostras de solo pode ser explicada pela variação no número de sítios de ligação responsáveis pela interação com adsorvato assim como na força de interação entre a espécie alvo de estudo e os adsorventes.

Figura 15: Efeito do tempo de contato na adsorção do GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentração do GLYPH $40 \mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C

Há uma variedade de modelos cinéticos para examinar o mecanismo que controla o processo de adsorção. Estes modelos podem focar na existência ou não de reações químicas, controle de difusão e transferência de massa. Dentre estes modelos, os mais comumente utilizados são os de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem.

Com o intuito de se determinar a etapa limitante no processo de adsorção no sistema estudado, os dados da cinética de adsorção obtidos foram ajustados aos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e difusão intrapartícula.

O modelo de pseudo-primeira ordem foi descrito por Lagergren (Lagergren, 1898), e é representado em sua forma linearizada pela Equação 3.

$$\log (q_{eq} - q_t) = \log (q_{eq}) - \frac{k_1 t}{2,303} \quad (3)$$

Onde q_{eq} e q_t são as quantidades do GLYPH adsorvido ($\mu\text{mol g}^{-1}$) no equilíbrio e no tempo t (h) respectivamente; k_1 é a constante de velocidade de adsorção de pseudo-primeira ordem (h^{-1}). A estimativa da constante k_1 pode ser obtida a partir de um gráfico de $\log (q_e - q_t)$ por t (Figura 16). Os valores obtidos estão sumarizados na Tabela 11.

Figura 16: Teste do modelo de pseudo-primeira ordem para a adsorção de GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentração do GLYPH 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C

O modelo de pseudo-segunda ordem foi aplicado conforme o sugerido por Ho e Mckay (Ho & McKay, 1999). Sua representação linearizada é dada pela Equação 4.

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_{eq}^2} + \frac{t}{q_{eq}} \quad (4)$$

Onde q_{eq} e q_t são as quantidades do GLYPH adsorvido ($\mu\text{mol g}^{-1}$) no equilíbrio e no tempo t (h); k_2 é a constante de velocidade de pseudo-segunda ordem ($\text{g } \mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$). A partir de um gráfico de t/q_t por t (Figura 17), o modelo pode ser estudado e o valor de k_2 é estimado (Tabela 11).

Figura 17: Teste do modelo de pseudo-segunda ordem para a adsorção de GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentração do GLYPH $40 \mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C

Em um sistema de adsorção sólido-líquido, a transferência do soluto é normalmente caracterizada pela transferência de massa, difusão intrapartícula ou ambas. Para se verificar se o processo de difusão intrapartícula é um fator determinante para taxa de transferência no processo de adsorção estudado, os dados experimentais obtidos foram ajustados ao modelo de difusão intrapartícula de Weber e Morris (Weber Jr., Morris, & Sanit, 1963) representado pela Equação 5.

$$q_t = k_{di} t^{1/2} + C \quad (5)$$

Onde q_t é a quantidade de GLYPH adsorvido ($\mu\text{mol g}^{-1}$); t o tempo de contato (h); k_{di} é o coeficiente de difusão intrapartícula; e C ($\mu\text{mol g}^{-1}$) é uma constante relacionada a resistência à difusão. Os valores de k_{di} e C podem ser estimados a partir da inclinação de um gráfico de q_t por $t^{0,5}$ (Figura 18). C nos dá uma ideia da espessura da camada limite, ou seja, maior valor de C , maior efeito da camada de limite.

Figura 18: Teste do modelo de difusão intrapartícula para a adsorção de GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentração do GLYPH $40 \mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C

Para se determinar o modelo que melhor descreve os sistemas estudados, uma função erro se faz necessária. O coeficiente de determinação, R^2 , foi escolhido, pois

uma regressão linear implicitamente minimiza a soma dos quadrados do erro para determinar os parâmetros da equação (Badawy et al., 2010). A Tabela 11 sumariza as informações obtidas dos três modelos aplicados. Observa-se que para todos os solos trabalhados, o modelo que melhor se ajustou foi o de pseudo-segunda ordem. O ajuste ao modelo de pseudo-segunda ordem indica a possibilidade de quimissorção ou adsorção ativada (De Carvalho et al., 2010), contudo, estimativas sobre a entalpia de ligação seriam necessárias para se confirmar tal mecanismo.

Comparando-se os valores de k_2 para os solos trabalhados, observa-se que o Latossolo B apresentou maior valor da constante ($6,5 \text{ g } \mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Sendo o Latossolo B, a amostra de solo com maior conteúdo mineral e sabendo-se que o GLYPH irá interagir preferencialmente com tais solos, sua maior constante de velocidade de segunda-ordem corrobora a hipótese de que o processo de sorção ocorrerá com a maior taxa para este tipo de solo (Borggaard & Gimsing, 2008).

Tabela 11: Parâmetros cinéticos para a adsorção de GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentração do GLYPH 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C

Solo	Modelo						
	Pseudo-primeira ordem		Pseudo-segunda ordem		Difusão intrapartícula		
	k_1 (h^{-1})	R^2	k_2 (g $\mu\text{mol}^{-1} \text{h}^{-1}$)	R^2	k_{di} ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{0.5}$)	C ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	R^2
Latossolo B	$0,13 \pm 0,07$	0,912	$6,5 \pm 3,2$	0,999	$0,019 \pm 0,005$	$1,16 \pm 0,02$	0,662
Chernossolo A	$0,066 \pm 0,002$	0,898	$0,77 \pm 0,08$	0,995	$0,058 \pm 0,008$	$0,15 \pm 0,03$	0,887
Chernossolo B	$0,095 \pm 0,02$	0,681	$4,6 \pm 1,7$	0,999	$0,022 \pm 0,006$	$0,42 \pm 0,02$	0,700

4.6.2. Isotermas de adsorção e dessorção

Como as soluções geradas a partir de fortificações com AMPA e GLYPH em meio de extrato de solo isento de GLYPH e AMPA apresentaram valores de recuperação fora da faixa aceitável para concentrações menores que $2,8 \mu\text{mol L}^{-1}$, decidiu-se obter as curvas de calibração em matriz similar a das amostras (também isentas dos analitos). A linearidade se manteve igual ao do intervalo trabalhado anteriormente (entre $0,4$ e $12,8 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Seguindo o sistema de classificação para isotermas de adsorção de Giles e Smith (Giles & Smith, 1974), observou-se que todas as isotermas obtidas são do tipo L (Figura 19). O percentual de adsorção decresceu, em média, de 86% para a concentração inicial de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para 12% para o ponto com concentração inicial de $640 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O processo de adsorção do GLYPH em solos pode ser explicado pela interação entre o grupo fosfonato e grupos hidroxila da superfície de óxidos de ferros presentes em solos conforme o esquema ilustrado na Figura 2.

O pH das dispersões variou de 5,6 para 4,9 no Latossolo B; de 5,6 para 5,5 no Chernossolo A; e de 5,7 para 5,6 no Chernossolo B. Enquanto a variação de pH nos Chernossolos A e B estão dentro da variação experimental, de acordo com o mecanismo B da Figura 2, ou seja, formação de complexo binuclear e bidentado. Para o Latossolo B, há uma significativa diminuição de pH. Isto implica em um mecanismo com liberação de prótons, ou seja, seguindo o mecanismo A ou C, com a formação de complexo mononuclear e monodentado.

Figura 19: Isotermas de adsorção do GLYPH ajustadas aos modelos de (a) Freundlich e (b) Langmuir em diferentes amostras de solo. Condições: concentrações do GLYPH 10-640 μmol L⁻¹; dose de adsorvente = 3 g L⁻¹ para Latossolo B e 6 g L⁻¹ para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C

Os dados para os três diferentes solos (Latossolo B, Chernossolo A e Chernossolo B) se ajustaram as equações de Freundlich e Langmuir ($R^2 > 0,82$). O modelo de Freundlich foi o mais adequado para as amostras Latossolo B e Chernossolo A e de Langmuir obteve o melhor valor do coeficiente de determinação, R^2 , para Chernossolo B (Tabela 12).

Tabela 12: Parâmetros de Freundlich e Langmuir para a adsorção e dessorção de GLYPH em diferentes amostras de solo. Condições: concentrações do GLYPH 10-640 $\mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C

		Modelo					
Amostra	Processo	Freundlich			Langmuir		
		K_F ($\mu\text{mol}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{g}^{-1}$)	$1/n$	R^2	q_{max} ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	$K_L (\text{L g}^{-1})$	R^2
Latossolo B	Adsorção	$0,53 \pm 0,07$	$0,23 \pm 0,02$	0,965	$2,1 \pm 0,2$	$0,063 \pm 0,029$	0,872
	Dessorção	$0,63 \pm 0,10$	$0,20 \pm 0,06$	0,692	$1,2 \pm 0,1$	$0,86 \pm 0,25$	0,859
Chernossolo A	Adsorção	$0,22 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,02$	0,976	$1,4 \pm 0,1$	$0,031 \pm 0,007$	0,967
	Dessorção	$0,38 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,04$	0,859	$0,85 \pm 0,03$	$0,82 \pm 0,15$	0,964
Chernossolo B	Adsorção	$0,33 \pm 0,08$	$0,21 \pm 0,04$	0,825	$1,1 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,03$	0,940
	Dessorção	$0,40 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,09$	0,645	$0,91 \pm 0,08$	$0,69 \pm 0,26$	0,841

O solo com maior capacidade de adsorção é o Latossolo B, como pode ser constatado pelos valores de K_F e $q_{\max}$. Este dado corrobora com a hipótese levantada na literatura (Borggaard & Gimsing, 2008) de que o GLYPH é fortemente sorvido por solos constituídos predominantemente por material mineral em oposição a solos com maior teor de matéria orgânica, como os solos Chernossolo A e B.

Comparando-se os valores de K_F (Tabela 13) obtidos para solos em questão e o obtido para um trabalho do grupo realizado com um sistema SIA (Colombo & Masini, 2011) e com o relatado por Mamy e Barriuso (Mamy & Barriuso, 2005), observa-se consistência nos valores.

Tabela 13: Comparação de parâmetros de Freundlich para diferentes solos em diferentes estudos

Amostra de solo	Parâmetros de Freundlich	
	K_F ($\text{mg}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{kg}^{-1}$)	$1/n$
Latossolo B	136 ± 12	$0,23 \pm 0,02$
Chernossolo A	$64,2 \pm 6,3$	$0,30 \pm 0,02$
Chernossolo B	$79,8 \pm 13,3$	$0,21 \pm 0,04$
Solo argiloso¹	170 ± 4	$0,58 \pm 0,04$
Châlons²	$34,8 \pm 0,6$	$0,80 \pm 0,02$
Dijon²	$41,9 \pm 0,5$	$0,80 \pm 0,02$
Toulouse²	276 ± 13	$0,77 \pm 0,02$

¹(Colombo & Masini, 2011) ²(Mamy & Barriuso, 2005)

A dessorção do GLYPH foi verificada com a adição de 9 mL de solução de KCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ao solo contendo o herbicida adsorvido e 1 mL restante do sobrenadante

resultante da centrifugação das amostras do estudo de adsorção. Posteriormente, descontou-se da concentração medida o conteúdo presente no 1 mL de sobrenadante.

Os dados obtidos para dessorção também se ajustaram aos modelos de Freundlich e Langmuir (Figura 20), contudo com valores de coeficientes de determinação (R^2) bem menores que os observados para o processo de adsorção (Tabela 12).

Figura 20: Isotermas de dessorção do GLYPH ajustadas aos modelos de (a) Freundlich e (b) Langmuir em diferentes amostras de solo. Condições: concentrações do GLYPH 10-640 $\mu\text{mol L}^{-1}$; dose de adsorvente = 3 g L^{-1} para Latossolo B e 6 g L^{-1} para Chernossolo A e B; temperatura = 25°C

A quantidade de GLYPH dessorvido para as diferentes concentrações variou entre 4 e 55% da quantidade inicialmente adsorvida (quando se foi de 10 a 640 $\mu\text{mol L}^{-1}$

¹). Isto é um forte indício de que a lixiviação do GLYPH pode ocorrer em considerável extensão neste tipo de sistema, o que poderia tornar o herbicida disponível em ecossistemas aquáticos.

5. CONCLUSÕES

O método proposto se mostrou capaz de determinar o glifosato e seu principal metabólito, ácido aminometilfosfônico, em amostras de água e extratos de solo, além do ingrediente ativo em formulação comercial.

Em termos das melhorias propostas no início, não foi possível eliminar a etapa de aquecimento e diminuir o tempo de análise. Contudo, a análise pode ser configurada em apenas uma única corrida, além de ter tido sua aplicabilidade expandida para a utilização com extratos de solo (algo não testado no método proposto anteriormente).

Com relação aos parâmetros validados, o método atendeu as recomendações para a análise de espécies em nível de traços em termos de precisão e exatidão. Além disso, com um LD de $17 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ de $56 \mu\text{g L}^{-1}$, o método é capaz de detectar e quantificar o glifosato em concentrações abaixo dos limites estabelecidos pelas agências US-EPA ($700 \mu\text{g L}^{-1}$) e CONAMA ($65 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas doces e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ na somatória com o AMPA em águas subterrâneas).

Quando aplicado nos estudos de adsorção e dessorção do glifosato em diferentes amostras de solo, o método se mostrou adequado, pois os parâmetros de Freundlich e Langmuir obtidos foram comparáveis com dados da literatura. Os limites de detecção e quantificação permitiram investigar as isotermas de adsorção sob condições de baixo grau de ocupação dos sítios de adsorção, que é uma situação ambientalmente representativa, ou seja, uma condição em que há excesso de adsorvente em relação ao adsorvato.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, P. H. B. de, & Alonzo, H. G. A. (2014). Trabalho rural e riscos à saúde: uma revisão sobre o “uso seguro” de agrotóxicos no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 19(10), 4197–4208.
- Albers, C. N., Banta, G. T., Hansen, P. E., & Jacobsen, O. S. (2009). The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil - Comparing different soils and humic substances. *Environmental Pollution*, 157(10), 2865–2870.
- ANVISA. (n.d.). Índice Monográfico G01 - Glifosato. Recuperado de <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G01%2B%2BGlifosato.pdf/6a549ab8-990c-4c6b-b421-699e8f4b9ab4>
- Araújo, A. S. F. de, Monteiro, R. T. R., Abakerli, R. B., Souza, L. S. De, & Teresa, R. (2003). Biodegradação de glifosato em dois solos brasileiros. *Revista Ecotoxicologia E Meio Ambiente, Curitiba*, 13, 157–164.
- Azadi, H., & Ho, P. (2010). Genetically modified and organic crops in developing countries: A review of options for food security. *Biotechnology Advances*, 28(1), 160–168.
- Badawy, N. A., El-Bayaa, A. A., & Abd AlKhalik, E. (2010). Vermiculite as an exchanger for copper(II) and Cr(III) ions, kinetic studies. *Ionics*, 16(8), 733–739.
- Batista, A. D., Chocholouš, P., Šatinský, D., Solich, P., & Rocha, F. R. P. (2015). On-line hyphenation of solid-phase extraction to chromatographic separation of sulfonamides with fused-core columns in sequential injection chromatography. *Talanta*, 133, 142–149.
- Batista, A. D., Nascimento, C. F., Melchert, W. R., & Rocha, F. R. P. (2014). Expanding the separation capability of sequential injection chromatography: Determination of melamine in milk exploiting micellar medium and on-line sample preparation. *Microchemical Journal*, 117, 106–110.
- Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., & Abbondandolo, A. (1997). Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1957–1962.
- Borggaard, O. K., & Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, 64(April 2008), 441–456.
- Cartigny, B., Azaroual, N., Imbenotte, M., Mathieu, D., Vermeersch, G., Goullé, J. P., & Lhermitte, M. (2004). Determination of glyphosate in biological fluids by ¹H and ³¹P NMR spectroscopy. *Forensic Science International*, 143(2–3), 141–145.
- Carvalho, F. P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy*, 9(7–8), 685–692.
- Catrinck, T. C. P. G., Dias, A., Aguiar, M. C. S., Silvério, F. O., Fidêncio, P. H., & Pinho, G. P. (2014). A simple and efficient method for derivatization of glyphosate and AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(7), 1194–1199.
- Chamkasem, N., & Harmon, T. (2016). Direct determination of glyphosate, glufosinate, and

- AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(18), 4995–5004.
- Chocholouš, P., Dědková, L., Boháčová, T., Šatínský, D., & Solich, P. (2017a). Fast separation of red colorants in beverages using cyano monolithic column in Sequential Injection Chromatography. *Microchemical Journal*, 130, 384–389.
- Chocholouš, P., Gil, R., Acebal, C. C., Kubala, V., Šatínský, D., & Solich, P. (2017b). Multilayered particle-packed column: Evaluation and comparison with monolithic and core-shell particle columns for the determination of red azo dyes in Sequential Injection Chromatography. *Journal of Separation Science*, 40(6), 1225–1233.
- Chocholouš, P., Solich, P., & Šatínský, D. (2007). An overview of sequential injection chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 600(1–2 SPEC. ISS.), 129–135.
- Colombo, S. de M., & Masini, J. C. (2011). Developing a fluorimetric sequential injection methodology to study adsorption/desorption of glyphosate on soil and sediment samples. *Microchemical Journal*, 98(2), 260–266.
- Colombo, S. de M., & Masini, J. C. (2014). A sequential-injection reversed-phase chromatography method for fluorimetric determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid. *Anal. Methods*, 6(2), 490–496.
- Comissão Europeia. (1998). Directiva 98/83/CE DO CONSELHO de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade de água destinada ao consumo humano. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015L1787&from=PT>
- Comissão Europeia. (2018). EU Pesticides database - European Commission. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>
- CONAMA. (2005). Resolução n 357, 18 de março de 2005 (DOU n° 053, de 18/03/2005). *Diário Oficial Da União*, (53), 58–63. Recuperado de <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>
- CONAMA. (2008). Resolução n 396, 3 de abril de 2008 (DOU n° 066, de 07/04/2008). *Diário Oficial Da União*, (66), 64–68. Recuperado de <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>
- Coutinho, C. F. B., Coutinho, L. F. M., Mazo, L. H., Nixdorf, S. L., & Camara, C. A. P. (2008). Rapid and direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water using anion-exchange chromatography with coulometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1208(1–2), 246–249.
- Cowell, J. E., Kunstman, J. L., Nord, P. J., Steinmetz, J. R., & Wilson, G. R. (1986). Validation of an Analytical Residue Method for Analysis of Glyphosate and Metabolite: An Interlaboratory Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(6), 955–960.
- Da Silva, A. S., Fernandes, F. C. B., Tognolli, J. O., Pezza, L., & Pezza, H. R. (2011). 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*, 79(5), 1881–1885.
- Database National Center for Biotechnology Information. (n.d.). PubChem Compound. Database (glyphosate). Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3496>

- De Carvalho, T. E. M., Fungaro, D. A., & Izidoro, J. C. (2010). Adsorção do corante reativo laranja 16 de soluções aquosas por zeólita sintética. *Quimica Nova*, 33(2), 358–363.
- De Prá Urio, R., & Masini, J. C. (2015). Evaluation of sequential injection chromatography for reversed phase separation of triazine herbicides exploiting monolithic and core-shell columns. *Talanta*, 131, 528–534.
- Delmonico, E. L., Bertozzi, J., Souza, N. E. de, & Oliveira, C. C. (2014). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC. *Acta Scientiarum. Technology*, 36(3), 513.
- Dos Santos, A. C. V., & Masini, J. C. (2010). A análise por injeção sequencial (SIA): Vinte anos em uma perspectiva brasileira. *Quimica Nova*, 33(9), 1949–1956.
- EFSA. (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, 13(11), 4302. Recuperado de <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.4302>
- Faria, A. M., Bottoli, C. B. G., Jardim, I. C. S. F., & Collins, C. H. (2006). Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. *Quimica Nova*, 29(2), 300–309.
- Foley, J. P., & Dorsey, J. G. (1983). Equations for Calculation of Chromatographic Figures of Merit for Ideal and Skewed Peaks. *Analytical Chemistry*, 55(4), 730–737.
- Foo, K. Y., & Hameed, B. H. (2010). Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*, 156(1), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.09.013>
- Franco, C. da R., & Pelaez, V. (2016). A (Des) Construção Da Agenda Política De Controle Dos Agrotóxicos No Brasil. *Ambiente & Sociedade*, XIX(3), 215–232.
- Freitas, A., Spitz, C., & Oliveira, E. (2014, 30 de janeiro). Brasil fiscaliza agrotóxico só em 13 alimentos, enquanto EUA e Europa analisam 300. O Globo. Recuperado de <https://oglobo.globo.com/economia/defesa-do-consumidor/brasil-fiscaliza-agrotoxico-so-em-13-alimentos-enquanto-eua-europa-analisam-300-11446519>
- Giles, C., & Smith, D. (1974). A general treatment and classification of the solute Adsorption Isotherm. *Journal of Colloid and Interface Science*, 9797(74), 90252.
- Gimsing, A. L., & Borggaard, O. K. (2002). Competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides. *Clay Minerals*, 37(3), 509–515.
- Gimsing, A. L., Borggaard, O. K., & Sestoft, P. (2004). Modeling the Kinetics of the Competitive Adsorption and Desorption of Glyphosate and Phosphate on Goethite and Gibbsite and in Soils. *Environmental Science and Technology*, 38(6), 1718–1722.
- Grandcoin, A., Piel, S., & Baures, E. (2017). AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. *Water Research*, 117, 187–197.
- Grossman, E. (2015, 23 de abril). What Do We Really Know About Roundup Weed Killer? National Geographic. Recuperado de <https://news.nationalgeographic.com/2015/04/150422-glyphosate-roundup-herbicide-weeds/>
- Guiochon, G. (2007). Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1168(1–2), 101–168.
- Hammerl, A., & Klapötke, T.M. (2011). Nitrogen: Inorganic Chemistry. *Encyclopedia of Inorganic*

and *Bioinorganic Chemistry*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd.

- Hanke, D., Melo, V. de F., Dieckow, J., Dick, D. P., & Bognola, I. A. (2015). Influência da matéria orgânica no diâmetro médio de minerais da fração argila de solos desenvolvidos de basalto no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, 39(6), 1611–1622.
- Ho, Y. S., & McKay, G. (1999). Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, 34(5), 451–465.
- Horstkotte, B., Jarošová, P., Chocholouš, P., Sklenářová, H., & Solich, P. (2015). Sequential injection chromatography with post-column reaction/derivatization for the determination of transition metal cations in natural water samples. *Talanta*, 136, 75–83.
- Huclová, J., Šatínský, D., & Karlíček, R. (2003). Coupling of monolithic columns with sequential injection technique: A new separation approach in flow methods. *Analytica Chimica Acta*, 494(1–2), 133–140.
- IBAMA. (2016, 16 de novembro). Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Recuperado de <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>
- Idris, A. M. (2014). The Second Five Years of Sequential Injection Chromatography: Significant Developments in the Technology and Methodologies. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 44(3), 220–232.
- Idris, A. M., & Alnajjar, A. O. (2013). Native fluorescent detection with sequential injection chromatography for doping control analysis. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1.
- Idris, A. M., & Elgorashe, R. E. E. (2014). Eco-friendly, cost-effective and fast method for the estimation of furosemide and amiloride in tablet formulation by sequential injection chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(12), 1193–1198.
- Idris, A. M., Elgorashe, R. E. E., Assubaie, F. N., & Alnajjar, A. O. (2011). Inexpensive green method for diclofenac assay utilizing sequential injection chromatography. *Chromatographia*, 73(5–6), 431–437.
- INMETRO (2010). DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre a validação de método analíticos. INMETRO. Recuperado de http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf.
- International Agency for Research on Cancer. (2015, 20 de março). IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. IARC News. Recuperado de <https://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf>
- Islas, G., Rodriguez, J. A., Mendoza-Huizar, L. H., Pérez-Moreno, F., & Carrillo, E. G. (2014). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soils by HPLC with pre-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37(9), 1298–1309.
- IUPAC. (2014). Adsorption. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, 2167(Recommendations 1990), 2171. Recuperado de <https://doi.org/10.1351/goldbook.A00155>
- Jangbai, W., Wongwilai, W., Grudpan, K., & Lapanantnoppakhun, S. (2012). Sequential Injection Chromatography as Alternative Procedure for the Determination of Some Food Preservatives. *Food Analytical Methods*, 5(4), 631–636.

- Khrolenko, M. V., & Wieczorek, P. P. (2005). Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chl. *Journal of Chromatography A*, 1093(1–2), 111–117.
- Lagergren, S. (1898). Zur Theorie der Sogenannten Adsorption Gelöster Stoffe, Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens. *Handlingar*, 24(4), 1–39.
- Lee, J. H., Park, H. N., Park, H. J., Heo, S., Park, S. S., Park, S. K., & Baek, S. Y. (2017). Development and Validation of LC–MS/MS and LC-Q-Orbitrap/MS Methods for Determination of Glyphosate in Vaccines. *Chromatographia*, 80(12), 1741–1747.
- Lenahan, C. E., Barnett, N. W., & Lewis, S. W. (2002). Sequential injection analysis. *The Analyst*, 127(8), 997–1020.
- Levine, I. N. (2009). *Physical Chemistry: Sixth Edition*. New York, NY: McGraw Hill Higher Education.
- Mallat, E., & Barceló, D. (1998). 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*, 823(1–2), 129–136.
- Mamy, L., & Barriuso, E. (2005). Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops. *Chemosphere*, 61(6), 844–855.
- Marek, L. J., & Koskinen, W. C. (2014). Simplified analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, vegetation and soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Pest Management Science*, 70(7), 1158–1164.
- Masini, J. C. (2008). Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da análise por injeção seqüencial. *Química Nova*, 31(3), 704–708.
- Monsanto Company. (2018). Glifosato em 6 Passos. Recuperado de <http://descubra.monsanto.com.br/glifosato/>
- Munira, S., Farenhorst, A., Flaten, D., & Grant, C. (2016). Phosphate fertilizer impacts on glyphosate sorption by soil. *Chemosphere*, 153, 471–477.
- Nascimento, R. F. do, Lima, A. C. A., Vidal, C. B., Melo, D. de Q., & Raulino, G. S. C. (2014). *Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais*. Fortaleza, CE: Imprensa Universitária.
- Nedelkoska, T. V., & Low, G. K. C. (2004). High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytica Chimica Acta*, 511(1), 145–153.
- OECD. (2000). OECD 106 Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method. *OECD Guideline for the Testing of Chemicals*, (January), 1–44. Recuperado de https://archive.epa.gov/scipoly/sap/meetings/web/pdf/106_adsorption_desorption_using.pdf
- Oliveira-Silva, J. J., Alves, S. R., Meyer, A., Perez, F., Sarcinelli, P. de N., da Mattos, R. de C. O., & Moreira, J. C. (2001). Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 35(2), 130–135.

- Pinto, P. C. A. G., Lúcia, M., Saraiva, M. F. S., & Lima, J. L. F. C. (2011). Sequential injection analysis hyphenated with other flow techniques: A review. *Analytical Letters*, 44(1–3), 374–397.
- Possidônio De Amarante Junior, O., Rodrigues, T. C., & Santos, D. (2002). Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos E Legislação. *Quim. Nova*, 25(4), 589–593.
- Prasad, B. B., Jauhari, D., & Tiwari, M. P. (2014). Doubly imprinted polymer nanofilm-modified electrochemical sensor for ultra-trace simultaneous analysis of glyphosate and glufosinate. *Biosensors and Bioelectronics*, 59, 81–88.
- Qian, K., Tang, T., Shi, T., Wang, F., Li, J., & Cao, Y. (2009). 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*, 635(2), 222–226.
- Ribani, M., Grespan Bottoli, C. B., Collins, C. H., Fontes Jardim, I. C. S., & Costa Melo, L. F. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771–780.
- Rigobello-Masini, M., & Masini, J. C. (2013). Improvements in the separation capabilities of sequential injection chromatography: Determination of intracellular dissolved free amino acid profiles in three taxonomic groups of microalgae. *Phytochemical Analysis*, 24(3), 224–229.
- Rossi, M. (2015, 30 de abril). O “alarmante” uso de agrotóxicos no Brasil atinge 70% dos alimentos. El País Brasil. Recuperado de https://brasil.elpais.com/brasil/2015/04/29/politica/1430321822_851653.html
- Saito, T., Miura, N., Namera, A., Oikawa, H., Miyazaki, S., Nakamoto, A., & Inokuchi, S. (2012). Mixed-mode C-C 18 monolithic spin-column extraction and GC-MS for simultaneous assay of organophosphorus compounds, glyphosate, and glufosinate in human serum and urine. *Forensic Toxicology*, 30(1), 1–10.
- Sasal, M. C., Demonte, L., Cislighi, A., Gabioud, E. A., Oszust, J. D., Wilson, M. G., & Repetti, M. R. (2015). Glyphosate loss by runoff and its relationship with phosphorus fertilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18), 4444–4448.
- Sato, K., Jin, J. Y., Takeuchi, T., Miwa, T., Suenami, K., Takekoshi, Y., & Kanno, S. (2001). Integrated pulsed amperometric detection of glufosinate, bialaphos and glyphosate at gold electrodes in anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 919(2), 313–320.
- Sheals, J., Sjöberg, S., & Persson, P. (2002). Adsorption of glyphosate on goethite: Molecular characterization of surface complexes. *Environmental Science and Technology*, 36(14), 3090–3095.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9th ed.). Belmont, CA: Brooks/Cole.
- Songa, E. A., Arotiba, O. A., Owino, J. H. O., Jahed, N., Baker, P. G. L., & Iwuoha, E. I. (2009). Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. *Bioelectrochemistry*, 75(2), 117–123.
- Šrámková, I., Chocholouš, P., Sklenářová, H., & Šatínský, D. (2015). On-line coupling of Micro-Extraction by Packed Sorbent with Sequential Injection Chromatography system for direct

- extraction and determination of betaxolol in human urine. *Talanta*, 143, 132–137.
- Steinborn, A., Alder, L., Michalski, B., Zomer, P., Bendig, P., Martinez, S. A., & Costa Pinheiro, N. (2016). Determination of Glyphosate Levels in Breast Milk Samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(6), 1414–1421.
- Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Ivanova, E. V., Epiktetov, D. O., & Leontievsky, A. A. (2015). Microbial degradation of glyphosate herbicides (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 188–195.
- Tamlin, C. D. S. (1997). *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 11th Edition.
- Tarazona, J. V., Court-Marques, D., Tiramani, M., Reich, H., Pfeil, R., Istace, F., & Crivellente, F. (2017). Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Archives of Toxicology*, 91(8), 2723–2743.
- The State of Food Insecurity in the World: The 2015 Meeting* (FAO Report 2015). (2015). Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of The United Nations
- US EPA. (1990). Method 547, Determination of glyphosate in drinking water by direct-aqueous injection HPLC, Post column derivatization and fluorescence detection. *Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency*. Recuperado de <https://www.o2si.com/docs/epa-method-547.pdf>
- US EPA. (1993). R.E.D. Facts - Glyphosate, 1–7. Recuperado de <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0178fact.pdf>
- US EPA. (1995). National Primary Drinking Water Regulations - Glyphosate. Recuperado de <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/20001S06.PDF?Dockey=20001S06.PDF>
- US EPA. (2018). 180.364 - Glyphosate: tolerances for residues. Recuperado de https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=2c85909360c7c5aff63ddd1447545d6a&mc=true&node=se40.24.180_1364&rgn=div8
- Weber Jr., W. J., Morris, J. C., & Sanit, J. (1963). Kinetics of Adsorption on Carbon from Solution. *Journal of the Sanitary Engineering Division, American Society of Civil Engineers*, 89, 31–38.
- World Population Prospects The 2017 Revision* (United Nations Report 2017). (2017). New York, United States: United Nations.
- Yushchenko, D. Y., Malysheva, L. V., Baranova, S. S., Khlebnikova, T. B., & Pai, Z. P. (2013). Determination of glyphosate in the oxidation products of N-phosphonomethyl iminodiacetic acid by IR spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 68(11), 961–964.
- Zhang, C., She, Y., Li, T., Zhao, F., Jin, M., Guo, Y., & Wang, J. (2017). A highly selective electrochemical sensor based on molecularly imprinted polypyrrole-modified gold electrode for the determination of glyphosate in cucumber and tap water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(30), 7133–7144.

7. ANEXO

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Erico Aparecido Oliveira Pereira

Local e data de nascimento: São Paulo (SP), 13 de novembro de 1989.

2. EDUCAÇÃO

Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 2009-2014.

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas.

Escola Estadual Francisco Milton de Andrade, Guarulhos (SP), 1997-2007.

3. OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), julho 2016 – julho 2018.

Estagiário de Assuntos Regulatórios, Monsanto do Brasil, fevereiro 2014 – dezembro 2014.

4. PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Apresentação oral no 5º Congresso Analítica. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em amostras ambientais utilizando colunas monolíticas em cromatografia líquida por injeção sequencial. 2017. (Congresso).