**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

SANDRO DE MIRANDA COLOMBO

Glifosato e ácido aminometilfosfônico: desenvolvimento de metodologias de análise por injeção sequencial e investigação sobre processos adsortivos e fisiológicos de interesse ambiental

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

20/01/2012

SANDRO DE MIRANDA COLOMBO

Glifosato e ácido aminometilfosfônico: desenvolvimento de metodologias de análise por injeção sequencial e investigação sobre processos adsortivos e fisiológicos de interesse ambiental

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química

Orientador: Prof . Dr. Jorge Cesar Masini

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Colombo, Sandro de Miranda
C718g Glifosato e ácido aminometilfosfônico : desenvolvimento de metodologias de análise por injeção sequencial e investigação sobre processos adsorptivos e fisiológicos de interesse ambiental / Sandro de Miranda Colombo. -- São Paulo, 2011.
158p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Masini, Jorge Cesar

1. Análise por injeção sequencial : Química 2. Adsorção : Físico-química 3. Herbicidas : Produtos químicos agrícolas 4. Voltametria : Química analítica I. T. II. Masini, Jorge Cesar, orientador.

543.08 CDD

“Glifosato e ácido aminometilfosfônico: desenvolvimento de metodologias de análise por injeção sequencial e investigação sobre processos adsorptivos e fisiológicos de interesse ambiental”

SANDRO DE MIRANDA COLOMBO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Química.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Jorge Cesar Masini

(Orientador e Presidente)

Prof^a Dr^a Nina Coichev

IQ – USP

Prof^a Dr^a Pérola de Castro Vasconcellos

IQ – USP

Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis

CENA – USP

Prof. Dr. Gilberto Abate

UFPR

Dedico esta Tese:

Aos meus pais, a minha família e aos meus queridos padrinhos Alfredo e Cecília pelo constante incentivo a perseverar no caminho dos estudos.

A minha esposa Cibeles.

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Jorge Cesar Masini pela oportunidade conferida e paciência dedicada;

À Dr^a Marilda Rigobello Masini pela contribuição científica permitida a mim;

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate pelo incentivo e ensinamentos;

À Prof. Dr^a. Luciana Bagdeve de Oliveira dos Santos pela amizade e ensinamentos eletroanalíticos;

Ao Prof. Dr. Lúcio Angnes pelas críticas destinadas no intuito de enriquecer meus conhecimentos;

Ao Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira cuja presença é sempre a certeza de aprendizagem significativa;

Ao Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha pelas críticas;

Ao Dr. José Carlos Pires Penteado pela amizade e contribuições sempre aproveitáveis;

Ao Dr. Allan Cezar Viera dos Santos pela amizade e incentivo;

À Prof^a Alice Ramos da Luz pelo carinho e incentivo;

À Prof^a Vânia de Almeida Pollitti pela amizade e cuja parceria é a concretização de um ótimo trabalho;

Ao Prof. Sylvio Pasetto Filho e família pelos ensinamentos e amizade

Ao Prof. Antônio Osmar Orlandini pela amizade e conhecimentos possibilitados;

Ao Prof. Marcos Müller pela amizade e contínuo incentivo;

Ao Prof. Carlos Alberto Heness pelos ensinamentos;

À Prof^a Maria Cecília Corassa pelo apoio e carinho;

Ao mestre Carlos Eduardo Souto de Oliveira pela amizade e incentivo;

A todos da ETEC Vila dos Remédios pela amizade, carinho e por possibilitarem um ambiente de trabalho agradável;

Aos técnicos do Instituto de Química pela atenção, amizade e colaboração;

Aos colegas do laboratório por propiciarem sempre momentos de reflexão e ensinamentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

“Não acreditamos que criaturas humanas e comunidades humanas consigam ser felizes sem a ideia de Deus e sem respeito aos semelhantes.” (Francisco Cândido Xavier)

RESUMO

Colombo, S. de M.) **Glifosato e ácido aminometilfosfônico: desenvolvimento de metodologias de análise por injeção sequencial e investigação sobre processos adsorptivos e fisiológicos de interesse ambiental.** Ano 2011. 158p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Descreve-se o desenvolvimento de um método de análise por injeção sequencial para determinação de glifosato em formulações comerciais por voltametria de onda quadrada em eletrodo de gota de mercúrio. O glifosato foi derivatizado em modo estacionário com ácido nitroso para produção de N-nitroso glifosato, que é eletroativo. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram 0,7 e 2,4 mg L⁻¹ (4 e 14 µmol L⁻¹), respectivamente. O método foi aplicado a três formulações, obtendo resultados que diferiram do valor indicado pelo fabricante por -2,6, -0,8 e -28%. Em seguida descreve-se o desenvolvimento de um método de injeção sequencial para a determinação fluorimétrica de glifosato. Esse método baseou-se em uma primeira etapa de conversão de glifosato a glicina por reação com hipoclorito de cálcio, seguida por reação com *o*-ftaldialdeído na presença de 2-mercaptoetanol (OPA-MCE) em tampão borato (pH > 9) para produzir o composto fluorescente (2'-hidroxietiltio)-2-N-alkilisoindol (excitação em 340 nm e emissão em 450 nm). O método apresentou resposta linear para concentrações entre 0,25 e 25,0 µmol L⁻¹, com LD e LQ de 0,08 e 0,25 µmol L⁻¹ (14 e 42 µg L⁻¹), respectivamente, e frequência de amostragem de 18 análises por hora. O método foi aplicado para estudar as propriedades de adsorção / dessorção em um solo e em uma amostra de sedimento. Os dados das isotermas de adsorção e dessorção foram tratados pelas equações de Freundlich e Langmuir, que permitiram estimar uma capacidade de adsorção de 1384 ± 26 e 295 ± 30 mg kg⁻¹ para as amostras de solo e sedimento, respectivamente.

A determinação de glifosato e AMPA em amostras de água foi realizada por cromatografia por injeção sequencial com detecção fluorimétrica explorando as mesmas reações com hipoclorito e OPA-MCE. A solução transportadora com papel de fase móvel foi composta por mistura metanol: tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8) na proporção 25:75 (v v⁻¹). A frequência de amostragem foi de 6 análises por hora, com LD e LQ de 0,14 e 0,42 µmol L⁻¹ para AMPA e 0,11 e 0,33 µmol L⁻¹ para glifosato, respectivamente. Testes de adição e recuperação em amostras de águas naturais enriquecidas com 0,50 µmol L⁻¹ desses compostos levaram a taxas de recuperação de 82 a 140% para AMPA e de 84 a 96% para glifosato.

Investigou-se o efeito do herbicida em cultivos de duas espécies de microalgas marinhas - a Chlorophyta, *Tetraselmis gracilis* e a diatomácea, *Phaeodactylum tricornutum*. Para isso adicionou-se diferentes concentrações de glifosato (2 a 1000 mg L⁻¹) a cultivos crescendo em fase exponencial. Doses de 2 e 50 mg L⁻¹ provocaram leve aumento de crescimento algal quando comparados com o cultivo controle sem glifosato. O rendimento quântico da fotossíntese aumentou levemente em alguns dias no cultivo de *P. tricornutum* em concentrações baixas de glifosato. Na concentração de glifosato de 200 mg L⁻¹ houve declínio do crescimento e acentuada queda do rendimento quântico da fluorescência da fotossíntese. Perfis dos aminoácidos aromáticos, tirosina, triptofano e fenilalanina apresentaram diferenças nas algas.

Palavras-chave: Glifosato, AMPA, micro-algas, SIA, SIC.

ABSTRACT

Colombo, S. de M.) **Glyphosate acid aminomethylphosphonic: development of sequential injection analytical methods and investigation on adsorptive and physiological processes of environmental interest.** Year 2011. 158p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

We describe a development of a voltammetric method for determination of glyphosate in commercial formulations using sequential injection analysis to carry the sample to a flow cell adapted to the capillary of a mercury drop electrode. Glyphosate is batch-derivatized with nitrous acid in hydrochloric acid to produce N-nitroso glyphosate, which is electroactive. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.7 and 2.4 mg L⁻¹, respectively. The method was applied to three formulations, obtaining results that differed from the value indicated by the manufacturer by -2.6, -0.8 and -28%. Next, the thesis describes the development of a sequential injection method to automate the fluorimetric determination of glyphosate based on a first step of oxidation to glycine by hypochlorite, followed by reaction with *o*-phthalaldehyde in presence of 2-mercaptoethanol (OPA-MCE) in borate buffer (pH>9) to produce a fluorescent 1-(2'-hydroxyethylthio)-2-*N*-alkylisoindole. The proposed method exhibited a linear response for glyphosate concentrations between 0.25 and 25.0 µmol L⁻¹, with LOD and LOQ of 0.08 and 0.25 µmol L⁻¹, respectively. The sampling rate of the method was 18 samples per hour. The method was applied to study adsorption/desorption properties in a soil and in a sediment sample. Adsorption and desorption isotherms were properly fitted by Freundlich and Langmuir equations, leading to adsorption capacities of 1384 ± 26 and 295 ± 30 mg kg⁻¹ for the soil and sediment samples, respectively.

Determination of glyphosate and AMPA in water samples was performed by sequential injection chromatography (SIC) with fluorimetric detection by exploiting the same reactions with hypochlorite and OPA-MCE. The carrier solution plays a role of mobile phase, being composed of 25:75 (v v⁻¹) methanol : 10 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.8). The chromatographic step enhanced the method selectivity. The sampling throughput was 6 analyzes per hour with LOD and LOQ of 0.14 and 0.42 µmol L⁻¹ for AMPA and 0.11 and 0.33 µmol L⁻¹ for glyphosate, respectively. Recovery tests in natural water samples enriched with 0.50 µmol L⁻¹ in the compounds led to recovery rates from 82 to 140% for AMPA and 84 to 96% for glyphosate.

We investigated the effect of the herbicide on cultivation of two species of marine microalgae - the Chlorophyta, *Tetraselmis gracilis* and the diatomaceous *Phaeodactylum tricornutum*. To achieve this goal, different concentrations of glyphosate (2 to 1000 mg L⁻¹) were added to cultures growing in exponential phase. Doses between 2 and 50 mg L⁻¹ caused a slight increase in algal growth compared to the control culture without glyphosate. The quantum yield of photosynthesis increased slightly in some days in the cultivation of *P. tricornutum* at low concentrations of glyphosate. The glyphosate concentration of 200 mg L⁻¹ decreases the cell growth and caused a marked decline in the fluorescence quantum yield of photosynthesis. Profiles of aromatic amino acids, tyrosine, tryptophan and phenylalanine differed in the algae.

Keywords: Glyphosate, AMPA, marine microalgae, SIA, SIC.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS	16
1.2 GLIFOSATO	18
1.2.1 Características físico-químicas	20
1.2.2. Mecanismos de ação e implicações ambientais	22
1.2.3. Rotas de degradação	25
1.2.4. Sorção de Glifosato.....	27
1.3. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	31
1.3.1. Equação de Langmuir	33
1.3.2. Equação de Freundlich.....	33
1.4. DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO	35
1.4.1 Voltametria	36
1.4.1.1 Técnicas de Pulso.....	37
1.4.1.2 Voltametria aplicada na determinação de glifosato	42
1.5. FLUORIMETRIA.....	43
1.5.1. Fluorimetria e glifosato.....	45
1.5.2 Medidas da fluorescência da fotossíntese	46
1.6. ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL (SIA).....	47
1.7. CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO POR INJEÇÃO SEQUENCIAL (SIC).....	51
2.0 OBJETIVOS	55
3.0 PARTE EXPERIMENTAL	57
3.1 APARELHOS E REAGENTES	57
3.2.1 Obtenção de N-nitroso glifosato	58
3.2.2 Condições do sistema de análise por injeção em fluxo.....	59
3.2.3 Determinação de glifosato em formulações comerciais	61
3.2.4 Estudo de pré-concentração	61
3.3 DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE GLIFOSATO E AMPA UTILIZANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL.....	64
3.3.1. Reagentes e soluções.....	64
3.3.2. Procedimento de Análise por Injeção Sequencial.....	65
3.3.3. Amostras de água.....	69
3.3.4 Estudos de adsorção e dessorção de glifosato em solo e sedimento de rio	70

3.3.4.1 Amostras de solo e sedimento.....	70
3.3.4.2 Construção das isotermas de adsorção.....	70
3.4 DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO POR INJEÇÃO SEQUENCIAL.....	71
3.4.1. Materiais	71
3.4.2. Equipamento de Cromatografia por Injeção Sequencial	72
3.4.3. Procedimento para efetuar as etapas para derivatização e separação de glifosato e AMPA no sistema SICromTM.....	75
3.5 EFEITO DE GLIFOSATO EM CULTIVOS DE MICROALGAS.....	78
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.1. DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE GLIFOSATO	79
4.1.1 Figuras de mérito	83
4.1.2. Etapa de pré-concentração/mudança de matriz.....	86
4.1.3 Interferências	87
4.1.4 Determinação de glifosato em formulações comerciais	90
4.2.1.1 Conversão de glifosato à glicina.....	95
4.2.1.2 Conversão de glicina em 1-(2'-hidroxietiltio)-2-N-alkilisoindol	100
4.2.2 Figuras de Mérito.....	101
4.2.3 Estudos de Adsorção e Dessorção	103
4.3 DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE GLIFOSATO E AMPA: APLICAÇÃO A AMOSTRAS DE ÁGUAS	106
4.3.1 Estudo de interferentes na determinação de glifosato	106
4.3.2 Determinação de AMPA.....	109
4.3.2.1 Avaliação da influência da temperatura na determinação de AMPA.....	109
4.3.2.2 Avaliação da influência do número de etapas de amostragem contendo AMPA no sinal analítico.....	110
4.3.2.3 Avaliação da influência da vazão de envio da mistura reacional ao detector.....	114
4.3.3 Análise em amostras de águas	115
4.4. DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO POR INJEÇÃO SEQUENCIAL.....	118
4.5. ESTUDO DO EFEITO DE GLIFOSATO EM CULTIVOS DE MICROALGAS	131
5.0 CONCLUSÕES.....	140
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	142

FIGURAS

FIGURA 1. 1: Estruturas do glifosato (a) e do ácido aminometil fosfônico (b).	19
FIGURA 1. 2: Equilíbrios de ionização do glifosato e seus respectivos pk's.	21
FIGURA 1. 3: Rotas de degradação microbiana sugeridas para o glifosato pela formação de sarcosina ou AMPA.....	26
FIGURA 1. 4: Proposta de esquemas de reação entre glifosato e óxido de ferro.	29
FIGURA 1. 5: Tipos de isotermas de Adsorção atribuídas por Giles et al (1974).....	31
FIGURA 1. 6: Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo	39
FIGURA 1. 7: Esquema representativo da Voltametria de Onda Quadrada	40
FIGURA 1. 8: Forma de aplicação do potencial na Voltametria de Onda Quadrada (Souza et al, 2003).....	41
FIGURA 1. 9: Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada processos redox reversível e irreversível (Souza et al, 2003).....	42
FIGURA 1. 10: Estados eletrônicos do spin das moléculas (Skoog et al, 2009)	44
FIGURA 1. 11: Diagrama de Jablonski (Skoog et al, 2009).....	45
FIGURA 1. 12: Sistema típico de análise por injeção sequencial.....	48
FIGURA 3. 1: Sistema de injeção sequencial para determinação voltamétrica de glifosato previamente derivatizado a N-nitroso glifosato	60
FIGURA 3. 2: Representações das resinas IRA-68 (a) e IRA 900 Cl (b)	62
FIGURA 3. 3: Configuração do sistema SIA para determinação fluorimétrica de glifosato e AMPA.....	65
FIGURA 3. 4: Sistema SICrom TM de cromatografia a liquido por injeção seqüencial	74
FIGURA 4. 1: Voltamograma de onda quadrada de uma solução de N-nitroso glifosato decomposto em suas componentes de corrente direta, corrente reversa e a corrente líquida.....	81
FIGURA 4. 2: Influência da frequência de onda quadrada na corrente de pico de redução de uma solução de N-nitroso glifosato.	83
FIGURA 4. 3: Voltamogramas de soluções de N-nitroso glifosato em HCl 1,0 mol L ⁻¹ usados para construção de uma curva analítica.....	84

FIGURA 4. 4: Voltamogramas de onda quadrada do composto N-nitroso glifosato usados para construção de curva de adição de padrão	91
FIGURA 4. 5: Curva de adição de padrão sobreposta a curva analítica de calibração externa para a quantificação de glifosato em formulação comercial..	92
FIGURA 4. 6: Configuração da amostragem feita da mistura reacional que foi enviada ao reator aquecido no digestor	96
FIGURA 4. 7: Influência do pH da solução de hipoclorito de cálcio na obtenção do sinal analítico para uma solução de glifosato.	99
FIGURA 4. 8: Avaliação da influência do tempo de permanência da mistura reacional na bobina de aquecimento (48 ⁰ C) para soluções de glifosato e glicina.	99
FIGURA 4. 9: Sinais transientes de fluorescência e curva analítica obtidos para soluções-padrões de glifosato.....	102
FIGURA 4. 10: Isotermas de adsorção e dessorção (25.0 ± 0.5 ⁰ C) para concentrações iniciais de glifosato entre 0,87 e 54 mg L ⁻¹ (solo) e entre 0,87 e 27 mg L ⁻¹ (sedimento).....	104
FIGURA 4. 11: Avaliação da influência da temperatura na determinação de AMPA.	110
FIGURA 4. 12: Configurações adotadas da mistura reacional enviada ao detector	111
FIGURA 4. 13: Influência do número de ciclos de amostragem no sinal analítico.....	112
FIGURA 4. 14: Avaliação da influência da vazão de envio da mistura reacional contendo AMPA e OPA-MCE ao detector na obtenção do sinal analítico.....	114
FIGURA 4. 15: Cromatogramas de AMPA, glicina e mistura de glifosato e AMPA em concentração 5,0 µmol L ⁻¹	119
FIGURA 4. 16: Triplicata de cromatogramas de uma mistura de AMPA e glifosato 5,0 µmol L ⁻¹ na presença de impurezas de glicina	121
FIGURA 4. 17: Cromatogramas de uma mistura de AMPA e glifosato 5,0 µmol L ⁻¹ em comparação com o cromatograma de uma mistura dos mesmos compostos nas mesmas concentrações, mas na presença de 10 mg L ⁻¹ de ácido fúlvico.....	122
FIGURA 4. 18: Cromatogramas para construção de uma curva analítica para AMPA e glifosato.....	123
FIGURA 4. 19: Cromatogramas de soluções de AMPA e glifosato 5,0 µmol L ⁻¹	125
FIGURA 4. 20: Cromatogramas para construção de uma curva analítica para AMPA e glifosato nas concentrações (a) branco; (b) 0,50; (c) 1,0; (d) 2,5; (e) 5,0 e (f) 10,0 µmol L ⁻¹	126

FIGURA 4. 21: Duplicata de cromatogramas de uma mistura de AMPA e glifosato na concentração 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobrepostos ao branco de análise	127
FIGURA 4. 22: Curvas de crescimento celular de (a) <i>T. gracilis</i> e (b) <i>P. tricornutum</i> na presença de diferentes concentrações de glifosato: 0 (B), 2, 50, 200 e 1000 mg L^{-1}	132
FIGURA 4. 23: Variação do pH ao longo dos dias de cultivo de (a) <i>T. gracilis</i> e (b) <i>P. tricornutum</i> em diferentes concentrações de glifosato: 0 (B), 2, 50, 200 e 1000 mg L^{-1}	132
FIGURA 4. 24: Curvas de fluorescência (a), fluorescência máxima (b) e rendimento quântico (c) para as microalgas <i>T. gracilis</i> (I) e <i>P. tricornutum</i> (II) em diferentes concentrações de glifosato: 0 (B), 2, 50, 200 e 1000 mg L^{-1}	132
FIGURA 4. 25: Variação das concentrações de aminoácidos aromáticos Tyr (a), Trp (b) e Phe (c) nas microalgas <i>T. gracilis</i> (I) e <i>P. tricornutum</i> (b) em função das concentrações de glifosato: 0 (B), 2, 50 e 200 mg L^{-1}	132
FIGURA 4. 26: Concentrações de glicina intracelular (a) e no meio de cultivos (b e c) em função do dia de cultivo e da concentração de glifosato adicionada: 0 (B), 2, 50, 200 e 1000 mg L^{-1}	132

TABELAS

TABELA 3. 1: Sequência de etapas da programação do SIA para a derivatização do glifosato.....	67
TABELA 4. 1: Equações das curvas de calibração, coeficientes de correlação das curvas analíticas, limites de detecção e quantificação (mg L^{-1})	85
TABELA 4. 2: Taxas de recuperação (%) de glifosato sob diferentes condições de extração em duas resinas de troca iônica para uma concentração inicial de glifosato de 50 ou 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	86
TABELA 4. 3: Efeito de alguns constituintes da matéria orgânica natural de águas (ácido húmico e fúlvico), metabólito do glifosato (AMPA) e outros herbicidas e metabólitos da atrazina na determinação da concentração de glifosato 5,0 mg L^{-1}	88
TABELA 4. 4: Efeito de alguns possíveis interferentes na determinação da concentração de uma solução de glifosato 4,0 mg L^{-1} na presença de 10,0 mg L^{-1} do interferente usando-se o procedimento de troca iônica na resina IRA-900 Cl	89

TABELA 4. 5: Resultados obtidos das análises de formulações comerciais de glifosato em comparação com o valor fornecido pelo fabricante	93
TABELA 4. 6: Avaliação dos tempos de permanência da mistura reacional na bobina aquecida a 48° C na taxa de conversão de glifosato em glicina	100
TABELA 4. 7: Parâmetros de Freundlich and Langmuir para adsorção de glifosato..	105
TABELA 4. 8: Efeito de outros herbicidas e metabólitos da atrazina na determinação da concentração de glifosato 845 $\mu\text{g L}^{-1}$	107
TABELA 4. 9: Efeito de alguns constituintes da matéria orgânica natural de águas (ácido húmico e fúlvico), e outras espécies inorgânicas na determinação da concentração de glifosato 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	108
TABELA 4. 10: Resultados obtidos para as diferentes fragmentações dos volumes totais das soluções de OPA/mercaptoetanol (50 μL) e AMPA 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (100 μL)..	113
TABELA 4. 11: Parâmetros analíticos obtidos das curvas analíticas de glifosato e AMPA	115
TABELA 4. 12: Resultados obtidos para estudos de adição e recuperação em amostras de água para glifosato e AMPA em 3 níveis de concentração	117
TABELA 4. 13: Tempos de retenção, parâmetros da curva analítica para uma faixa de concentrações de AMPA e glifosato entre 0,50 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (85 a 1690 $\mu\text{g L}^{-1}$) e os limites de detecção e quantificação do método	127
TABELA 4. 14: Resultados dos testes de adição e recuperação realizados em duplicata em três amostras de água enriquecidas com 0,50 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	130

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

Na produção agrícola, plantas que não oferecessem algo de interesse ao ser humano, como alimentos, fibras, etc. e que eram consideradas indesejáveis, foram denominadas de “daninhas” (Pitelli, Galli et al, 2005). A Botânica nos ensina que, na verdade, devemos considerar tais espécies como as que se desenvolveram geneticamente de modo a ocuparem áreas nas quais ocorreram profundas alterações na vegetação original (Pitelli, Galli et al, 2005). Assim, criaram *habitats* com condições adequadas para o desenvolvimento de novas populações (Pitelli, Galli et al, 2005). O crescimento da humanidade causou a expansão de áreas geográficas destinadas para a prática de atividades agrícolas ou pecuárias e desta maneira plantas pioneiras evoluíram e novas espécies surgiram (Pitelli, Galli et al, 2005). Então, devido ao aumento das necessidades de produção, assim como dos lucros, foram necessárias formas de se combater estas comunidades consideradas infestantes na ocupação de agrossistemas (Pitelli, Galli et al, 2005). Estas formas de controle foram adotadas de diversos modos, tais como a retirada destas plantas de acordo com seus portes, o que acarretou em uma seleção proporcionada pelo próprio ser humano (Pitelli, Galli et al, 2005). Ainda, pode-se citar a queima de restos dos cultivos após a colheita causando um efeito danoso à fauna local, pela morte de muitas espécies, por exemplo, de insetos (Pitelli, Galli et al, 2005). A capina manual foi substituída pelo uso de equipamentos agrícolas em contínuo desenvolvimento, o que possibilitou o plantio em linhas, intensificando a mobilização do solo e minimizando a rebrota precoce (Pitelli, Galli et al, 2005). Ao mesmo tempo em que as evoluções tecnológicas inseridas no século XX propiciavam um aumento na eficiência dos processos de plantio e colheita, também foram responsáveis por incentivarem alterações na forma de germinação destas plantas consideradas daninhas,

pois permitiram o desenvolvimento de complexos mecanismos de dormência de suas estruturas reprodutivas, resistência aos decompositores e à interessante capacidade de germinar e emergir de regiões mais profundas do solo (Pitelli, Galli et al, 2005). Assim, como decorrência de tais procedimentos adotados de trato ao solo, os impactos ambientais resultantes foram a erosão e a depleção dos teores de matéria orgânica e nutrientes, os quais, em muitos casos não foram reparados até os dias atuais (Pitelli, Galli et al, 2005).

O controle químico foi então uma maneira adotada na segunda metade do século XX levando desta maneira a um aumento expressivo no desenvolvimento da indústria de herbicidas (Pitelli, Galli et al, 2005). Muitos herbicidas possuem formas de ação diferentes em razão de suas diferentes classes químicas. Devido a isso sua utilização se deu inicialmente sem considerar os mecanismos de ação, não ocorrendo a seleção específica para as características da vegetação (Pitelli, Galli et al, 2005). Com o uso de compostos que atuam especificamente em sítios determinados do metabolismo vegetal, surgiram as primeiras populações que ofereceram resistência aos mesmos como uma resposta ao mecanismo de seleção provocado mais uma vez pelo homem (Pitelli, Galli et al, 2005). Desta forma, a aquisição de informações que levassem à compreensão dos efeitos que os mesmos causariam ao ambiente não foi totalmente conseguida a tempo, pois os processos de estudo não acompanharam a elevada rapidez e demanda com as quais os mesmos foram utilizados (Pitelli, Galli et al, 2005).

Várias alternativas foram buscadas no intuito de se diminuir a necessidade de uso dos defensivos químicos (Pitelli, Galli et al, 2005). Dentre estas, pode-se citar o uso de plantas transgênicas, as quais se tornaram resistentes à ação de algumas pragas (Carlisle et al, 1988). Entretanto, o uso destas não impede o desenvolvimento das espécies consideradas daninhas (Carlisle et al, 1988). O uso demasiado e contínuo de

defensivos químicos é o maior causador da contaminação de águas superficiais e subterrâneas (Carlisle et al, 1988). A lixiviação oriunda da ação da irrigação e das chuvas permite a contaminação de cursos d'água e reservatórios (Carlisle et al, 1988). Nesta ocorrência, a biota aquática pode ser atingida como, por exemplo, seres procariontes e eucariontes (Lehotay et al, 1998). O fitoplâncton, devido as suas semelhanças fisiológicas com plantas terrestres, se torna potencialmente vulnerável aos herbicidas (Delorenzo et al, 2008).

Assim, a comunidade microbiana impactada pelas ações humanas pode implicar em danos muito sérios ao ecossistema, pois com o comprometimento do ciclo de nutrientes, toda a cadeia alimentar pode ser afetada (Delorenzo et al, 2008).

1.2 GLIFOSATO

Glifosato, ou N-(fosfonometil)glicina, é um herbicida não seletivo e sistêmico que é aplicado na pós-emergência, sendo extensivamente utilizado no Brasil e no mundo, especialmente após o desenvolvimento da soja transgênica, uma vez que esta planta é resistente à ação do herbicida. Seu mecanismo de ação é a inibição competitiva da enzima 5-enol piruvilshiquimate-3-fosfato sintetase, uma enzima ausente em animais que é essencial para a síntese de aminoácidos aromáticos em plantas (Bolognesi et al, 1997; Amarante Jr. et al, 2002). O sucesso do glifosato deve-se à elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas, associada à baixa toxicidade ao meio ambiente, incluindo aí mamíferos, peixes e microrganismos. Por outro lado, Bolognesi et al. (1997) demonstraram que a formulação técnica de glifosato, conhecida como Roundup, tem atividade na indução de danos tóxicos e genotóxicos em diferentes sistemas experimentais, sugerindo a participação de agentes surfactantes da formulação na potencialização dos efeitos do componente ativo.

Moléculas de glifosato adsorvem fortemente ao solo e degradam-se rapidamente, sendo que seu principal produto de degradação é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), cuja estrutura química, juntamente com a da molécula de glifosato, são apresentadas na FIGURA 1.1 (Amarante Jr., 2002).

FIGURA 1. 1: Estruturas do glifosato (a) e do ácido aminometil fosfônico (b).

No Brasil, até 18/06/2007, a página da internet do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento apontava 45 formulações comerciais de glifosato, das quais cinco eram associações deste herbicida com outros, tais como: imidazonilona (ácido (RS)-5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)nicotínico), atrazina (6-cloro-N2etil-N4isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina), glifosato-sal de amônio, simazina (6-cloro-N2,N4-dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) e uréia. Estudos realizados com esse herbicida mostram que seu tempo de meia vida pode chegar a 60 dias. A degradação do glifosato pode ser acelerada pelas condições climáticas e do tipo de solo, sendo que o principal metabólito é o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (Amarante Jr., 2002).

1.2.1 Características físico-químicas

A fórmula molecular do glifosato é $C_3H_8NO_5P$, sua massa molar é 169,1 g e quando apresentado na forma de sal de isopropilamônio acrescenta-se ao mesmo o grupo $(CH_3)_2CHNH_3^+$ (228,2 g/mol) (Amarante Jr. et al, 2002). Qual seja sua forma apresentada, em condições ambientais é um sólido cristalino, muito solúvel em água (12 g L^{-1} a 25° C), quase insolúvel em solventes orgânicos comuns como acetona e etanol (Wauchope, 1976). Sua temperatura de fusão é de 200 ° C, sua densidade é 0,5 g cm^{-3} e possui uma alta estabilidade na presença da luz (Amarante Jr. et al, 2002).

Os valores de pKa, isto é, os antilogaritmos das constantes de ionização do glifosato são: $pK_1 = 0,8$; $pK_2 = 2,16$; $pK_3 = 5,46$; $pK_4 = 10,14$ (Pastore et al, 1990, Mallat e Barceló, 1998 e Wauchope, 1976). Os aminoácidos e seus derivados apresentam um comportamento zwitteriônico, quer dizer, possuem em sua estrutura grupos carregados com cargas opostas, formando um “sal interno” ou um “íon dipolar” podendo assumir uma carga global neutra, dependendo do pH. O grupo carboxílico em

sua estrutura possui caráter mais fortemente ácido que o grupo amina (Cikalo et al, 1996). As etapas de ionização previstas podem ser observadas na FIGURA 1.2.

FIGURA 1. 2: Equilíbrios de ionização do glifosato e seus respectivos pk's.

1.2.2. Mecanismos de ação e implicações ambientais

Como mencionando anteriormente, o glifosato atua principalmente através da inibição da atividade da enzima 5 fosfoenol piruvato shikimato sintase (FPSS). Essa enzima catalisa a adição do grupo carboxivinil do fosfoenol piruvato ao shiquimato 3 fosfato, reação correspondente ao penúltimo passo da rota do corismato, o qual é precursor da síntese de aminoácidos aromáticos (Funke et al 2006, Herrmann e Weaver 1999). A inibição da FPSS provoca aumento do nível de ácido shiquímico nas plantas em que o glifosato atua como herbicida, mas não nas plantas resistentes a glifosato, como a soja transgênica (Dill, 2005). Para que o ácido shiquímico seja produzido, ao menos 20% dos esqueletos de carbono obtidos no ciclo de Calvin - Benson, na chamada fase escura da fotossíntese, são utilizados (Aldesuquy e Ibragim 2000). O ácido shiquímico é precursor de muitas biomoléculas essenciais para o crescimento da planta. Por outro lado, o excesso de ácido shiquímico, num processo de retroalimentação negativa, pode ser inibidor de enzimas auxiliares no processo fotossintético, enquanto sua diminuição irá interferir na síntese do hormônio auxina, cuja diminuição afetaria a fotossíntese negativamente (De Maria et al, 2006). Outras enzimas podem ser afetadas pela ação do glifosato, como a invertase e a anidrase carbônica. A invertase converte a sacarose em glicose e frutose, sendo que esses podem atuar como sinais para induzir a expressão de genes que codificam para moléculas do aparato fotossintético. A anidrase carbônica atua concentrando dióxido de carbono no sítio da fotossíntese, aumentando sua eficiência (Hayat et al, 2001; Su et al, 1992). Alguns estudos mostram que o glifosato e outros xenobióticos, em baixas doses, podem estimular o crescimento vegetal (Wong, 2000). Esse efeito é chamado de hormese (Cedergreen et al, 2007). O mecanismo através do qual o crescimento vegetal é estimulado pelo glifosato ainda é questão de debate (Velini et al, 2008), dado que, para que a planta cresça deve haver um

aumento na taxa de fotossíntese ou uma diminuição da taxa de respiração. Esta última hipótese é improvável, pois a respiração deveria estar acelerada para produzir energia e redutores necessários no processo de detoxificação necessário para que a planta resista ao xenobiótico (Cedergreen e Olesen, 2010). Por outro lado, se a adição de pequenas doses de glifosato promover aumento da eficiência na captação de luz na fase clara da fotossíntese, pode haver, como consequência, aumento da taxa de assimilação de carbono e do rendimento da fotossíntese e, portanto, crescimento (Purrington e Bergelson, 1999). Esses efeitos podem ocorrer em meio aos processos acima descritos nos quais o ácido shiquímico atua como mediador. Entretanto, embora essas hipóteses já estejam sendo consideradas pela maioria dos autores aqui citados, ainda não existe um esquema claro explicando a ação do glifosato no metabolismo vegetal, seja quando o glifosato está atuando como herbicida, ou, quando em doses baixas, atua estimulando o crescimento de plantas.

O glifosato é geralmente aplicado em plantas terrestres, mas, por efeitos de runoff, pode atingir corpos de água e afetar plantas não alvo, como as populações fitoplanctônicas, que são a base da teia alimentar aquática (Cedergreen e Strelbig, 2005). Herbicidas afetam o crescimento do fitoplâncton mesmo em concentrações muito baixas, de cerca de 1% da dose que foi aplicada em solo (Bouton et al, 2000). Além disso, plantas aquáticas permanecem expostas ao herbicida durante mais tempo que as plantas terrestres, ou a vários herbicidas ao mesmo tempo. O glifosato pode afetar de maneira diferente as diversas espécies de microorganismos fotossintetizantes aquáticos. Cianobactérias podem ter seu crescimento aumentado pelo uso do glifosato, enquanto outras espécies de microalgas podem apresentar diminuição no crescimento, embora o glifosato seja pouco tóxico para microalgas verdes (Forlani, 2008). A resistência ao glifosato apresentada por microorganismos terrestres e aquáticos promove

modificações na composição das comunidades microbianas, tanto do solo quanto aquáticas (Ratcliff et al 2006), o que pode afetar a disponibilidade, para o meio ambiente, de elementos produzidos no metabolismo desses microrganismos. Algas podem ser usadas como organismos modelo para compreender processos fisiológicos relacionados à exposição a herbicidas, dada a facilidade de cultivo e a homologia de seu metabolismo com outras plantas, especialmente no caso de algas verdes, das quais derivaram, durante a evolução, a maior parte das espécies de plantas superiores hoje conhecidas (Lipok et al, 2010).

Os estudos sobre efeitos do glifosato em plantas podem ser usados na criação de normas que determinem níveis mínimos aceitáveis nas áreas onde o herbicida é aplicado, bem como no seu entorno, incluindo corpos aquáticos. Para esses objetivos são usados parâmetros pré-estabelecidos pelas legislações ambientais vigentes, tais como doses letais do herbicida que causam morte de 50% de uma população de plantas, ou doses que causem 50% de um determinado efeito tóxico (Vendrell et al, 2009). Estudos que acompanham a introdução do glifosato a sistemas biológicos simples, como um cultivo unialgal, ou a um sistema complexo, do tipo mesocosmos, o qual contém produtores, herbívoros e predadores, possibilitam a compreensão dos efeitos de herbicidas tanto na fisiologia do vegetal quanto nas cascatas tróficas nas quais estão envolvidas as plantas afetadas (Relyea e Yurewicz, 2002, Relyea, 2005; Perez et al, 2007). Neste trabalho de tese foram estudados os efeitos de diferentes concentrações de glifosato em duas espécies de microalgas marinhas, a Chlorophyta, *Tetraselmis gracilis* e a diatomácea, *Phaeodactylum tricornutum*, visando compreender a influência desse herbicida no crescimento de duas algas que pertencem a diferentes grupos taxonômicos, apresentando fisiologias diversas e também diferentes influências na ecologia aquática.

1.2.3. Rotas de degradação

Como mencionado anteriormente, ácido aminometilfosfônico (AMPA) é o principal composto de degradação do glifosato e, na rota de sua formação, o primeiro passo é a clivagem da ligação C-N na molécula de glifosato pela enzima glifosato oxidorreductase, produzindo AMPA e glioxilato (FIGURA 1.3), sendo que esta reação ocorre sob o intermédio de uma flavoproteína denominada Oxidorreductase Glifosato (Kolpin et al, 2006; Jacob et al, 1988; Liu et al, 1991; Barry e Kishore, 1998 e Balthazor e Hallas, 1986).

AMPA é clivado para produzir fosfato inorgânico e metilamina (FIGURA 1.3), que é finalmente mineralizada a CO_2 e NH_4^+ (Kolpin et al 2006; Balthazor et al, 1986; e Pipke e Amrhein, 1988). A enzima C-P liase é a responsável pela clivagem do AMPA (Kononova et al, 2002; Ternan et al, 1998), reação essa que tem sido amplamente estudada, pois a clivagem da ligação C-P é um passo crítico na degradação do glifosato e outros fosfatados (Kononova et al, 2002 e Ternan et al, 1998). Apesar de todos os esforços aplicados ainda não foi possível determinar o exato mecanismo desta etapa de degradação (Kononova et al, 2002).

A enzima C-P liase é a responsável pela transformação de glifosato em fosfato e Sarcosina (FIGURA 1.3), sendo que esse último composto é degradado à glicina e formaldeído em uma reação catalisada pela enzima Sarcosina oxidase (Rueppel et al, 1977). Finalmente, CO_2 e NH_4^+ são formados (Rueppel et al, 1977). Até meados da década de 1980, acreditava-se que o AMPA era o principal metabólito (Carlisle et al, 1988). No entanto, em 1986 foi descoberto que a espécie *Pseudomonas bacterium*, é capaz de degradar glifosato à sarcosina sendo posteriormente isolada (Rueppel et al, 1977).

FIGURA 1. 3: Rotas de degradação microbiana sugeridas para o glifosato pela formação de sarcosina ou AMPA

Mais tarde, foi apontado que apenas dois dos microrganismos que utilizam o caminho do AMPA foram isolados de outras fontes que não efluentes industriais glifosato degradantes, enquanto que a utilização da via sarcosina tinha sido encontrada no meio-ambiente e laboratório (Dick e Quinn, 1995). Na verdade, uma ampla variedade de microrganismos do solo, incluindo bactérias, actinomicetos, fungos e microrganismos não identificados são capazes de degradar o glifosato, mas as bactérias parecem desempenhar o papel principal na degradação (Forlani et al, 1999). Se o caminho do AMPA ou o da sarcosina é o mais comum no solo, não se sabe e será difícil de determinar (Borggaard et al, 2008). Como AMPA é frequentemente detectado em

solo que recebeu glifosato, este caminho de degradação deve ser encontrado em solo com microrganismos (Borggaard et al, 2008). Sarcosina, por outro lado, não foi detectada no solo, o que pode simplesmente ser atribuído a sua rápida degradação, enquanto a maior resistência do AMPA se explica pela sua sorção ao solo, a qual lhe confere proteção contra novas degradações microbianas (Feng e Thompson, 1990 e Jacobsen, 2003).

1.2.4. Sorção de Glifosato

A mobilidade de um composto em solos depende de suas propriedades adsorptivas, sendo que adsorção forte e irreversível implica em imobilização do composto, enquanto adsorção fraca e reversível caracteriza alto potencial de lixiviação para lençóis freáticos e águas superficiais. A maior parte dos herbicidas é fraca ou moderadamente adsorvida em solos, sendo essa adsorção principalmente governada pela matéria orgânica, uma vez que muitas dessas moléculas são dominadas por estruturas alifáticas ou aromáticas, predominantemente apolares, tendo somente um grupo funcional (Oliveira Jr. et al, 2001; Borggaard and Gimsing, 2008). Em comparação com outros herbicidas, glifosato tem forte adsorção em minerais do solo em decorrência de sua estrutura química composta por vários grupos funcionais (carboxílico, amino e fosfonato), sendo que em pH entre 4 e 8, típicos de solo, encontra-se como ânion di- ou tri-valente (FIGURA 1.2), com forte afinidade por cátions trivalentes de Al^{3+} ou Fe^{3+} (Barja e dos Santos Afonso, 2005).

Borggaard e Gimsing (2008) compilaram dados de adsorção de glifosato em óxidos de ferro e alumínio e argilominerais, notando que quantidades de glifosato muito diferentes são adsorvidas dependendo da área superficial e do grupo mineral. Enquanto óxidos de ferro e alumínio tais como gibisita, ferrihidrita, goetita e hematita são capazes

de adsorver de 72 mmol kg⁻¹ (gibbsite) a 635 mmol kg⁻¹ (ferrihidrita), argilominerais como kaolinita, ilita e montmorilonita adsorvem entre 3,9 e 6,9 mmol kg⁻¹ de glifosato. A discrepância entre as duas classes de minerais foi atribuída à quantidade e distribuição dos sítios de adsorção, pois enquanto nos óxidos existe uma grande abundância de sítios disponíveis superficialmente contendo Fe e Al, nos argilominerais lamelares existem somente grupos OH localizados em camadas octaédricas, expostas apenas nas bordas da estrutura e não nas faces planares (de área muito maior). A capacidade de adsorção dos argilominerais depende também do cátion de saturação. Na compilação de Borggaard e Gimsing (2008), tanto a kaolinita, como a ilita e a montmorilonita encontravam-se em sua forma homoiônica de potássio, observando-se que a troca desse cátion por cátions divalentes e trivalentes, provocaram significativo aumento da capacidade de adsorção, especialmente no caso de Fe³⁺ e Al³⁺ (McConnel e Hossner, 1985).

A adsorção de glifosato é também dependente do pH, sendo que a quantidade adsorvida diminui com o aumento do pH (Barja e dos Santos Afonso, 2005), o que pode ser explicado pelo fato de que elevando-se o pH aumenta-se a densidade de cargas negativas no glifosato (FIGURA 1.2) e diminui-se a densidade de carga positiva na superfície do solo ou de seus minerais constituintes.

Resultados de espectroscopia infra-vermelho por transformada de Fourier com reflectância atenuada total (ATR-FTIR) e microscopia de força atômica (AFT) sugerem que a adsorção de glifosato em óxidos-hidróxidos de ferro e alumínio ocorre por troca de ligante com formação de complexos superficiais monodentados, por coordenação do grupo fosfonato a um simples grupo Fe-OH ou Al-OH, muito embora exista também a possibilidade de formação de complexos bidentados em grupos OH adjacentes na superfície mineral, ou mesmo um empacotamento denso em altas concentrações de

glifosato, como indicado na FIGURA 1.4. Essa última possibilidade é considerada pouco provável (Borggaard e Gimsing, 2008) em função do tamanho da molécula de glifosato. Esse aspecto seria uma explicação para o fato de que em estudos de adsorção de glifosato em diferentes minerais, geralmente se observa a ocupação de apenas metade dos sítios disponíveis.

FIGURA 1. 4: Proposta de esquemas de reação entre glifosato e óxido de ferro: (A) complexo superficial monodentado; (B) complexo bidentado; (C) formação de complexo monodentado com denso empacotamento a partir de complexo bidentado mediante aumento da concentração de glifosato. (Adaptado de Borggaard e Gimsing, 2008).

Do ponto de vista cinético, a adsorção de glifosato em solos é descrita por uma fase inicial rápida, responsável pela maior parte da adsorção, seguida por uma etapa lenta que pode demorar vários dias, com pequenos incrementos da quantidade de glifosato adsorvida. A rápida adsorção inicial é consistente com os mecanismos de interação propostos (FIGURA 1.4).

A matéria orgânica exerce um papel controverso na adsorção de glifosato. Alguns trabalhos sugerem que não existe uma correlação direta entre a concentração de matéria orgânica e a adsorção, ou mesmo que um aumento nessa concentração implica

numa diminuição da adsorção (Borggaard e Gimsing, 2008), como consequência de um bloqueio da matéria orgânica, dificultando o acesso do glifosato aos sítios de adsorção. Por outro lado, Piccolo et al (1996) descreveram forte interação entre glifosato e substâncias húmicas isoladas de diferentes solos, atribuindo essas interações à formação de ligações hidrogênio. Entretanto, Borggaard e Gimsing (2008) argumentam que ligações de hidrogênio não teriam força suficiente para que, do ponto de vista energético, suplantassem a repulsão eletrostática entre as cargas negativas das substâncias húmicas e o ânion de glifosato. Esses autores consideram que complexos ternários do tipo substâncias húmicas-Me-glifosato, com Me representando um cátion di- ou tri-valente, seria muito mais plausível, especialmente considerando que os estudos de Piccolo et al (1996) foram realizados em meio de CaCl_2 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, ou seja, com os íons Ca^{2+} exercendo a função de ponte metálica entre glifosato e a substância húmica.

Fosfato é um íon que sofre reações similares ao glifosato quanto à adsorção em solos e componentes minerais, ou seja, sendo adsorvido por processos de troca de ligante com sítios Al-OH e Fe-OH de carga variável e conseqüente formação de fortes ligações Fe-O-P e Al-O-P. Com isso ocorre competição entre fosfato e glifosato pelos sítios de adsorção dos solos, o que pode ter forte impacto na mobilidade de glifosato, especialmente em solos submetidos a intensas atividades de fertilização (Hart et al, 2004). A competição entre fosfato e glifosato foi demonstrada logo após o lançamento do herbicida em 1974 por Sprankle et al (1975), que concluíram que o teor de fosfato no solo seria o principal fator governando a adsorção de glifosato, de modo que altas concentrações de fosfato implicariam em elevado potencial de lixiviação do herbicida.

1.3. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Isotermas de adsorção ou de dessorção são os termos designados para as curvas obtidas a partir da relação entre a quantidade de soluto adsorvido com a concentração do mesmo na solução em equilíbrio (Falone e Vieira, 2004). Definem-se estes modelos em quatro classes (Giles et al, 1974), as quais são apresentadas na FIGURA 1.5:

- ✓ S e L (Langmuir);
- ✓ H (Alta afinidade);
- ✓ C (Constante de partição), as quais são ainda divididas em subgrupos.

FIGURA 1. 5: Tipos de isotermas de Adsorção atribuídas por Giles et al (1974)

A isoterma representada por “L” é aquela obtida quando o adsorvente possui microporos ou sítios de adsorção específicos, nos quais seus preenchimentos ou ocupações se dão por ordem crescente de tamanho ou afinidade, e, após a saturação dos

poros/sítios, a curva torna-se praticamente constante (Teixeira et al, 2001). As isotermas do **tipo “S”** apresentam forças de interação entre moléculas do soluto relativamente intensas e neste caso a energia de ativação para remover o mesmo do adsorvente é dependente de sua concentração. Assim, há a ocorrência de um processo conhecido como adsorção cooperativa (Giles et al, 1974) no qual após a adsorção inicial ocorrem alterações estruturais e/ou conformacionais que favorecem o processo adsorptivo até a saturação dos sítios.

Nos tipos de isotermas **“H”** os pontos se estendem praticamente sobre o eixo Y (concentração do soluto no adsorvente), o que evidencia desta forma uma alta afinidade entre o soluto e o adsorvente. Já para as isotermas do **tipo C**, representada por uma equação linear, há a ocorrência da partição do soluto entre a solução e o adsorvente.

A obtenção das isotermas de adsorção se dá por processos em batelada, nos quais massas iguais de adsorvente são colocadas em contato com volumes de soluções com diferentes concentrações de herbicida. Após um tempo de contato definido, sob agitação e temperatura constantes, separa-se o sobrenadante por filtração ou centrifugação e analisa-se a concentração de adsorbato remanescente em solução. A partir das diferenças entre as concentrações iniciais e finais das soluções, calcula-se a quantidade de matéria de adsorbato adsorvida por massa de adsorvente.

Os fenômenos de transporte e equilíbrio dos herbicidas através do solo podem ser melhor compreendidos através do estudo e aplicação dos modelos de isotermas de adsorção. Entre estas, estão as de Langmuir e Freundlich (Klug et al, 1998).

1.3.1. Equação de Langmuir

Baseada na teoria cinética dos gases e desenvolvida para descrever a adsorção dos mesmos em sólidos (Moore et al, 1968; Barrow et al, 1976; Atkins et al, 1999) é muito utilizada para o estudo da adsorção de solutos em soluções aquosas sobre sólidos (Klug et al, 1998; Sodré et al, 2001; Konda et al, 2002; Turiel et al, 2003), e é baseada nas seguintes hipóteses: a adsorção ocorre numa superfície corresponde ao recobrimento de apenas uma camada; todos os sítios de adsorção são equivalentes, a superfície é uniforme e não existem interações entre moléculas ou átomos de sítios vizinhos (Atkins et al, 1999; Moore et al, 1968). Assim, a equação de Langmuir é útil para o estudo da adsorção que ocorre por ligações químicas ou quimiossorção (Barrow et al, 1976). Pode-se representar a equação de Langmuir por:

$$q = a b C / (1 + b C) \quad (1.1)$$

onde **q** = massa ou quantidade de matéria do adsorbato por unidade de massa da fase sólida adsorvente (mg kg^{-1} ou mol kg^{-1}); **a** = capacidade máxima de adsorção (mg kg^{-1} ou mol kg^{-1}); **b** = termo relacionado à Energia Livre de Adsorção (L kg^{-1}) e **C** concentração do adsorbato livre no equilíbrio (mg L^{-1} ou mol L^{-1}).

1.3.2. Equação de Freundlich

Puramente empírica, a isoterma de Freundlich também pode ser aplicada para se estudar a adsorção de gases sobre sólidos (Giles et al, 1974). No entanto, aplica-se a mesma frequentemente para o estudo de solutos em soluções sobre sólidos (Vaz et al, 1997; Ebato et al, 2001; Gawlik et al, 1999; Moreau-Kervévan et al, 1998; Fingler et al, 2004; Lechón, et al, 1997; Javaroni et al, 1999). A equação 1.2 representa a equação de Freundlich:

$$\log(q) = \log K_f + (1/n) \log C \quad (1.2)$$

onde q = concentração do composto estudado em fase sólida (mg kg^{-1} ou mol kg^{-1}); “ K_f ” e “ $1/n$ ” são constantes empíricas relacionadas à sorção e finalmente C = Concentração do soluto em solução (mg L^{-1} ou mol L^{-1}).

Quando $1/n \cong 0$ a adsorção é independente da concentração do adsorbato em solução. Para $1/n = 1$, ou seja, quando $n = 1$ o termo “ q ” torna-se igual a $K_f \cdot C_e$. Assim, o valor de “ K_f ” aproxima-se daquele do coeficiente linear de partição, expresso por uma relação linear entre o soluto adsorvido e o soluto livre em solução no equilíbrio. Deste modo, quanto mais próximo de 1 for $1/n$, maior será a aproximação de um sistema em partição (Giles et al, 1974).

Geralmente, uma elevada tendência de adsorção de uma substância na matriz do solo está relacionada a uma mobilidade diminuída, sendo especialmente concordante com o glifosato conforme se observam a partir dos valores de suas constantes de adsorção (Sprankle et al, 1975; Hance et al, 1976; Piccolo e Celano, 1994) em diferentes materiais tais como solos com diferentes teores de matéria orgânica, argilominearis, óxidos, substâncias húmicas, etc. Vereecken (2005) apresenta uma revisão na literatura para os valores de K_f , que variam de 0,6 a $5,0 \times 10^5$, enquanto que os de $1/n$ se encontram na faixa de 0,46 e 1,16. Vários mecanismos, controlados por diferentes propriedades do solo, tem sido propostos para explicar essas variações (Vereecken, 2005).

1.4. DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO

A maioria dos métodos para determinação de glifosato é baseada em separações cromatográficas (Stalikas e Konidori, 2001). Métodos de cromatografia gasosa têm sido utilizados, acoplados a uma variedade de sistemas de detecção, como espectrômetros de massa (Alferness et al, 1994), captura de elétrons (Eberbach et al, 1991), fotometria de chama (Seiber et al, 1984) e detectores de nitrogênio e fósforo (Roy e Konor, 1989), mas estes envolvem uma preparação da amostra demorada, devido à necessidade de se converter o analito em compostos voláteis. Métodos de Cromatografia Líquida podem ser baseados em injeção direta, seguida de separação por troca iônica e detecção por UV no comprimento de onda de 195 nm (Burns, 1983), mas derivatizações pré e pós-coluna são propostos para produzir derivados fluorescentes no intuito de se melhorar a sensibilidade e a seletividade (Amarante Jr et al, 2002). Estes procedimentos são majoritariamente baseados nas reações com cloroformiato 9 fluorometiloxicarbonila (Fmoc) (Miles et al, 1988) ou com *o*-ftaldialdeído na presença de 2-mercaptoetanol (Abdullah et al, 1995). A Agência de Proteção ao meio-Ambiente Norte-Americana (United States Environmental Protection Agency – US-EPA) recomenda um método de cromatografia a líquido de alta eficiência usando coluna de troca iônica e derivatização pós-coluna com uma etapa inicial de conversão de glifosato em glicina por reação com hipoclorito, seguido de reação da glicina com *o*-ftaldialdeído na presença de 2-mercaptoetanol em tampão borato, pH 9,4 (Winfield et al, 1990) e detecção por fluorescência. Grey e colaboradores (Grey et al, 2001) desenvolveram um método de cromatografia líquida/espectrometria de massa (LC/ES/MS) para a determinação de glifosato e seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) utilizando glifosato marcado com isótopo como um método substituto. Também são relatados na literatura nos últimos anos métodos de Eletroforese Capilar, os quais utilizam pré-concentração

“off-line” e detecção por fluorescência induzida por laser (Molina e Silva, 2001 e Jiang e Lucy, 2007) ou espectrometria de massas com ionização por “electrospray” (Safarpour et al, 2005).

Métodos de Injeção em Fluxo para a determinação de glifosato são raros. Adock e colaboradores (Adock et al, 2004) descreveram a determinação de glifosato e sal de glifosato na forma de monoisopropilamônio em amostras industriais por análise por injeção em fluxo explorando a reação com tris (2,2 'bipiridila) rutênio (II) e detecção por quimioluminescência.

Os métodos espectrofotométricos são geralmente baseados na reação com ninidrina na presença de molibdato de sódio em soluções aquosas neutras a 100 ° C, levando à formação de um produto de coloração roxa com máximo de absorbância a 570 nm (Bhaskara e Nagaraja, 2006), mas a alta temperatura e os longos tempos de reação impossibilitaram a automação / mecanização da reação de análise por injeção em fluxo. Estudos de adsorção e dessorção têm sido feitos predominantemente por cromatografia a líquido de alta eficiência (Glass, 1987 e Pessagno et al, 2008) ou cintilação em meio líquido por contagem de ¹⁴C-glifosato (Jong e Jong, 1999 e Albers et al, 2009).

1.4.1 Voltametria

Diversas áreas de conhecimento como Química Ambiental, Físico-Química, Biologia Molecular e outras (Brainina, 1987) fazem uso do conjunto de técnicas voltamétricas de análise no intuito de se obterem informações sobre propriedades das substâncias (Souza et al, 2003). Neste conjunto de técnicas mede-se a corrente elétrica que flui entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar mediante a aplicação de um potencial, ou varredura de potencial entre o eletrodo de trabalho e um eletrodo de

referência (Souza et al, 2003). O perfil de corrente obtido em função do potencial aplicado permite estudar os mecanismos da reação eletroquímica, ou ainda reações em solução que ocorrem em função de espécies geradas eletroliticamente, ou ainda, do ponto de vista de análise química, pode-se relacionar as magnitudes de corrente geradas com a concentração das espécies de interesse.

O curto tempo de análise e o baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados em comparação a outras técnicas tais como cromatografia, possibilitaram o crescente interesse em se estudar e aperfeiçoar tais técnicas, alcançando-se assim limites de detecção cada vez mais baixos (Souza et al, 2003).

1.4.1.1 Técnicas de Pulso

A interface entre instrumentação analítica e computadores em contínuo progresso permitiu o controle digital da perturbação causada tanto ao eletrodo de trabalho como da medida do sinal resultante (Souza et al, 2003).

A medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial caracteriza a cronoamperometria (Souza et al, 2003). Suas formas de medida podem se dar relacionando tanto a largura do pulso quanto o degrau de potencial que é aplicado no eletrodo para promover o processo faradaico (Osteryoung e Osteryoung, 1985).

Diferenças quanto às formas de aplicação dos pulsos é o que definem as técnicas eletroanalíticas em questão (Osteryoung e Osteryoung, 1988). Assim, definem-se:

✓ **Voltametria de Pulso Normal:** as medidas de corrente são originadas pela programação de potencial formada por uma sequência de pulsos com tempo constante e amplitudes crescentes seguidas de forma concomitante da sobreposição a um potencial de base constante, sendo que neste último não ocorre nenhum processo faradaico e sim

uma corrente residual causada pela presença de oxigênio e outras impurezas dissolvidas com natureza eletroativa, assim como uma corrente capacitiva (Souza et al, 2003). A oxidação ou a redução do analito é causada pelo aumento do potencial de eletrodo que gera uma corrente faradaica que decresce rapidamente até o seu valor mínimo (Souza et al, 2003). Após a repetição da aplicação dos pulsos com valores crescentes de potencial e a coleta das correntes geradas obtém-se uma onda de perfil sigmoidal (Dahmen et al, 1986).

✓ **Voltametria de Pulso Diferencial:** os pulsos são aplicados com amplitudes iguais através de uma rampa linear de potencial, sendo que as medidas das correntes se dão em dois momentos distintos: no início e no fim da aplicação de cada pulso (Souza et al, 2003). O voltamograma resultante de forma gaussiana é gerado a partir de um gráfico que relaciona a subtração das correntes no final e antes da aplicação do pulso versus o potencial da rampa linear (Souza et al, 2003). A minimização da contribuição da corrente capacitiva, que cai muito mais rapidamente do que as correntes faradaicas (FIGURA 1.5), contribui para o aumento da sensibilidade do método em relação à de pulso normal (Souza et al, 2003).

✓ **Voltametria de Pulso Normal e Diferencial:** São obtidos modos alternados de medição dos pulsos, isto é, aplica-se um potencial E_1 após uma pequena variação de pulso, ΔE , ao valor E_2 (Souza et al, 2003). Após o restabelecimento ao valor do potencial inicial, são aplicados novamente outros pulsos em sentido contrário $-\Delta E$ (Souza et al, 2003). Desta forma, possibilita-se uma grande diferenciação das correntes faradaica e capacitiva, o que acarreta, por sua vez, no aumento de sensibilidade a pequenas correntes (Souza et al, 2003).

✓ **Voltametria de Escada:** Também conhecida pelo seu termo em inglês “Staircase”, possui parâmetros fixos de degraus e larguras de potencial (Souza et al,

2003). A medição é feita ao término de cada degrau, pelo fato de se obter o máximo de decaimento da corrente capacitiva (Souza et al, 2003).

As dependências das correntes faradaica e capacitiva relacionadas ao tempo e ao ponto onde a medida de corrente é realizada são mostradas na FIGURA 1.6 (Souza et al, 2003).

FIGURA 1. 6: Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo (Souza et al, 2003)

✓ **Voltametria de Onda Quadrada:** Possui grande rapidez e sensibilidade, atingindo limites de detecção comparáveis aos conseguidos pelas técnicas cromatográficas e espectroscópicas (Souza et al, 2003). A FIGURA 1.7 apresenta o esquema básico para a Voltametria de Onda Quadrada da maneira como foi proposta por Ramaley e Krause (Ramaley et al, 1969), que são representados e descritos a seguir (Souza et al, 2003):

- (1) aplicação do potencial na forma de onda quadrada;

- (2) potencial aplicado na forma de uma escada;
- (3) junção de onda quadrada com a variação na forma de escada;
- (4) forma obtida da onda de corrente total, nas quais $E \ll E_p$ tem equivalência a potenciais menos negativos que o potencial de pico, $E = E_p$ ao potencial de pico e $E \gg E_p$ conferem a potenciais mais negativos que o de pico;
- (5) medidas de corrente efetuadas antes, no e após o pico;
- (6) aplicação da corrente diferencial, na qual antes do potencial de pico a resultante é zero (as correntes direta e reversa são nulas), no potencial de pico alcança o valor máximo ($I_d - I_r$) e após o pico a corrente total se anula, pois ambas correntes difusionais possuem o mesmo sinal e, finalmente,
- (7) é a corrente total derivada.

FIGURA 1. 7: Esquema representativo da Voltametria de Onda Quadrada, onde as etapas representadas são: (1) forma do potencial; (2) potencial aplicado em escada; (3) potencial aplicado na técnica; (4) característica da onda da corrente; (5) sinal da corrente; (6) corrente diferencial e (7) corrente obtida (adaptado de Souza et al, 2003)

Na Voltametria de Onda Quadrada, a curva resultante de corrente-potencial é oriunda da varredura de potenciais com alturas (amplitudes) “ ΔE_s ” as quais variam com uma escada cuja largura é “ a ” e a duração τ (período) (Souza et al, 2003).

O eletrodo de trabalho é polarizado a um potencial no qual a reação de oxirredução não ocorre e a FIGURA 1.8 mostra de maneira detalhada a aplicação dos parâmetros descritos anteriormente (Souza et al, 2003).

FIGURA 1. 8: Forma de aplicação do potencial na Voltametria de Onda Quadrada (Souza et al, 2003)

A FIGURA 1.9 mostra os voltamogramas teóricos de sistemas reversíveis e não-reversíveis, caracterizados respectivamente pelas numerações (1) e (2) (Souza et al, 2003).

FIGURA 1. 9: Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde (1) representa um processo redox de um sistema reversível e (2) de um sistema irreversível (Souza et al, 2003)

Nos Estados Unidos da América e na Iugoslávia se deram o desenvolvimento dos modelos de estudo de espécies eletroativas com a utilização da Voltametria de Onda Quadrada pelos trabalhos dos grupos citados respectivamente por Janet Osteryoung e por Milivoj Lovric' (Souza et al, 2003).

1.4.1.2 Voltametria aplicada na determinação de glifosato

Métodos eletroquímicos têm sido também utilizados para a determinação de glifosato. Sato et al (2001) estudaram as propriedades eletroquímicas deste composto e verificaram a ocorrência de correntes catalíticas em função da oxidação do grupo amino

na superfície de eletrodos de ouro em meio alcalino. Estes autores desenvolveram um método de cromatografia iônica com detecção amperométrica pulsada atingindo um limite de detecção de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Outros trabalhos descrevem a nitroação do grupo amino previamente à determinação analítica. O composto nitroso-derivado é reduzido em eletrodo de gota de mercúrio em potencial próximo a $-0,75 \text{ V}$ contra o referência de Ag/AgCl . Teófilo et al (2004), explorando este comportamento do derivado nitrosado, otimizaram a determinação de glifosato por voltametria de onda quadrada, atingindo limites de detecção e quantificação de 25 e $80 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Garcia e Rollemberg (2007) propuseram um método direto de determinação de glifosato, sem necessidade de reações de derivatização, explorando a voltametria de pulso diferencial e eletrodo de trabalho de cobre. O método é baseado na formação de forte complexo entre íons Cu^{2+} gerados mediante varredura de potencial na direção anódica e o glifosato em solução, deslocando o potencial de pico de oxidação do eletrodo de cobre e intensificando o sinal de corrente. O método requer rigoroso controle de pH e os melhores resultados foram obtidos em meio tamponado com tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH $7,3 \pm 0,1$; velocidade de varredura, 10 mV s^{-1} ; amplitude do pulso de potencial, 150 mV ; duração do pulso, 150 ms ; modulação do pulso, 200 ms , sendo a corrente de pico na presença de glifosato observado em -187 mV (vs Ag/AgCl , KCl sat). Limites de detecção e quantificação foram de 59 e $196 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

1.5. FLUORIMETRIA

Quando um dos elétrons de uma molécula é excitado a um nível de energia superior podem-se formar os estados singlete ou tripleto, isto é, as diferenças entre ambos se dão pela ocorrência ou não na mudança dos spins eletrônicos do elétron

promovido. A FIGURA 1.10 mostra a ocorrência de ambas possibilidades nas quais as setas representadas são as direções dos spins (Skoog et al, 2009).

FIGURA 1. 10: Estados eletrônicos do spin das moléculas (Skoog et al, 2009)

Algumas transições eletrônicas podem ser representadas como na FIGURA 1.11 através do Diagrama de Jablonski, no qual as linhas horizontais grossas inferiores representam a energia do estado fundamental (S_0) e as superiores as de níveis energéticos mais elevados (S_1 , S_2 e T_1) (Skoog et al, 2009).

FIGURA 1. 11: Diagrama de Jablonski (Skoog et al, 2009)

Existem muitas maneiras dos elétrons retornarem a seus estados fundamentais e ambas são demonstradas pelas setas sinuosas e retas, mas antes deste retorno acontecer imediatamente, nota-se a relaxação vibracional, ou seja, o mesmo ocorre a partir do nível excitado de menor valor energético (Skoog et al, 2009). As setas sinuosas representam transições não radiativas, isto é, que ocorrem sem a emissão de luz, sendo exemplos destas, as denominadas conversões interna e externa, que são processos altamente eficientes de transferência de energia, porém seus mecanismos ainda necessitam de maiores esclarecimentos (Skoog et al, 2009).

1.5.1. Fluorimetria e glifosato

O método oficial de análise de glifosato e AMPA em águas recomendado pela Agência Americana de Proteção Ambiental (US-EPA) é baseado em separação dos analitos por cromatografia iônica seguida de derivatização pós-coluna e detecção por fluorescência (EPA, 1990). O reagente usado nesse método é uma mistura de *o*-ftaldialdeído e 2-mercaptoetanol (OPA-ME) em meio de tampão borato (pH 9,4). Esse

reagente é classicamente usado na determinação de aminoácidos (Hanczkó e Molnár-Perl, 2003), sendo que a amina primária do aminoácido reage com os grupos carbonila do *o*-ftaldialdeído, formando um isoindol com estrutura rígida e contendo ligações duplas conjugadas, conferindo rigidez estrutural e propriedades fluorescentes ao derivado. Essa reação ocorre facilmente com AMPA, que apresenta em sua estrutura o grupo amina primária, mas não com o glifosato, que contém um grupo amino secundário. Em função disso, no método oficial da EPA, imediatamente após a saída da coluna o fluxo de fase móvel recebe, por confluência, um fluxo de solução de hipoclorito de cálcio, responsável por converter glifosato em glicina (aminoácido contendo grupo amino primário). Em seguida, em outro ponto de confluência introduz-se a solução de OPA-ME para obtenção do derivado fluorescente que é detectado com excitação em 340 nm e emissão em comprimentos de onda maiores do que 450 nm.

Outro reagente altamente reativo com aminas, possuindo uma cadeia não polar altamente fluorescente e disponível comercialmente é o 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl). O complexo é facilmente formado em meio alcalino, sendo que a derivatização neste caso é feita no modo pré-coluna, produzindo espécies altamente fluorescentes que podem ser detectadas com máximo de fluorescência em 315 nm após excitação em 260 nm (Moye et al, 1979; Stalikas e Konidari, 2001).

1.5.2 Medidas da fluorescência da fotossíntese

Medidas de fluorescência da fotossíntese podem dar informações sobre as várias etapas que compõem o processo fotossintético, desde as reações de captura da luz nas membranas dos tilacóides, às reações de assimilação de dióxido de carbono no estroma cloroplástico, e também sobre as reações regulatórias desses processos. A fluorescência da fotossíntese medida com fluorímetro de amplitude de pulso modulado pode mostrar

como os diferentes componentes da dissipação da energia que incide no sistema vegetal estão variando, seja pela atenuação fotoquímica ou não fotoquímica, seja pela emissão de fluorescência.

O parâmetro mais usado é a medida de rendimento quântico da fotossíntese (Y), ou parâmetro de Genty (Genty et al, 1989), que baseia-se na relação entre a fluorescência no estado estacionário (F) e a fluorescência obtida após a aplicação de um pulso de luz saturante (Fm) à planta ($Y = (F_m - F) / F_m$). Um menor valor de Y, paralelo a um aumento de F, pode significar que está havendo algum dano no aparato fotossintético. A diminuição de Fm pode ser causada por perda de energia na forma de calor.

Assim, medidas de fluorescência de fotossíntese podem fornecer importantes informações sobre os mecanismos fisiológicos de ação do glifosato.

1.6. ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL (SIA)

Em 1990, na Universidade de Washington, os autores Ruzicka e Marshall (1990) propuseram este método no intuito de automatizar os procedimentos analíticos empregados no monitoramento e controle de etapas de processos industriais. Com isso os autores visaram um sistema de análises mecanicamente mais simples e robusto do que aqueles usados em Análise por Injeção em Fluxo (FIA), que apesar do sucesso obtido em análises seriais em bancadas de laboratório, encontrava dificuldades de adaptação em situações de monitoramento de processos, que requerem longos períodos de operação sem necessidade de manutenção e re-calibrações. Baseia-se nos mesmos três princípios básicos do FIA: injeção sequencial de zonas bem definidas de amostra e reagentes, dispersão parcial reprodutível, controle preciso do tempo (Ruzicka e Marshall, 1990). A formação do produto de reação se dá por interpenetração das zonas

de amostra e reagente em um único canal de fluxo, gerando um sinal transiente que resulta em um sinal analítico reprodutível (Gubeli et al, 1991).

São empregados de maneira usual nos sistemas SIA uma bomba de pistão como sistema de propulsão de fluídos e uma válvula seletora com múltiplas portas (tipicamente entre 8 e 10) controladas com auxílio de programas computacionais, o que permite a automação da manipulação da amostra. Um sistema típico é apresentado na FIGURA 1.12.

FIGURA 1. 12: Sistema típico de análise por injeção sequencial, mostrando os principais componentes: bomba de pistão, válvula de 2-vias de seringa (posições IN e OUT), bobina coletora, válvula seletora de 8 portas, bobina de reação e detector. Um computador com software apropriado controla movimentos sincronizados da bomba, da válvula de 2-vias, da válvula seletora e faz a aquisição de dados do detector.

A bomba de pistão (FIGURA 1.12) é conectada a uma válvula de duas vias que na posição “IN”, interrompe o contato entre a seringa e as portas da válvula seletora, permitindo aspirar uma quantidade pré-estabelecida de solução transportadora para a seringa. Na posição “OUT” a conexão da seringa (já contendo o volume apropriado de

solução transportadora) pode ser feita a qualquer porta da válvula seletora através da bobina coletora. As conexões das portas da válvula seletora podem ser feitas a reservatórios de soluções de reagentes e de amostra, dos quais pequenos volumes podem ser aspirados para o interior da bobina coletora, de forma, entretanto, a não atingir o interior da seringa. Desta maneira, se necessário for, há a possibilidade de se submeter a amostra a várias etapas de tratamento antes da determinação. Esta característica de versatilidade no tocante às possibilidades de conexões do SIA possibilita a automação do tratamento da amostra antes da reação analítica propriamente dita, podendo-se realizar, diluições, reações, misturas, pré-concentração da amostra, sem necessariamente aumentar a complexidade mecânica do sistema.

Pelo fato de se tratar de um sistema em linha única, o SIA não permite a homogeneização pela adição da amostra ao reagente por confluência como ocorre no FIA. Assim, a homogeneização no primeiro método ocorre apenas pelos processos de dispersão axial e radial. Devido à reversão da direção do fluxo da zona da amostra, assim como do efeito de turbulência causado pela bobina com geometria helicoidal, obtém-se a interdispersão adequada, desde que não se use volumes de amostra que gerem coeficientes de dispersão menor do que 2, e que o reagente esteja em concentração suficientemente alta para atender à estequiometria da reação (Gubeli et al, 1991; Masini, 2008). No caso de reações complexas que envolvam mais de dois reagentes, câmaras de diluição têm sido empregadas no intuito de se efetivar a homogeneização (Guzman et al, 1992, Vieira dos Santos et al, 2011), bobinas auxiliares de diluição e mistura (Galhardo e Masini, 2000), bem como a associação de SIA com análise por fluxo monossegmentado (Vieira et al, 1998; Silva et al, 2002). Assim, apesar desses procedimentos auxiliares como outros já citados levarem à diminuição da velocidade analítica, por outro lado, permitem a automação completa da análise.

A principal característica do SIA consiste em não ser necessário mudar a configuração física do sistema quando se deseja alterar parâmetros tais como volumes de amostra e reagentes, tempo de reação e realizar diluições da amostra (Ruzicka e Marxhall, 1990). Ainda, podem-se ressaltar outras características importantes:

- ✓ Não é necessária a conexão adicional de uma linha de fluxo para cada reagente que se deseja incrementar no método pelo fato de ser um sistema em linha única de relativa simplicidade e alta robustez (Economou et al, 2005);
- ✓ Pelo fato de utilizar quantidades de soluções pré-definidas (fluxo intermitente), o consumo das mesmas torna-se bastante reduzido;
- ✓ Solventes de diversas naturezas químicas podem ser utilizados pelo fato dos materiais constituintes do equipamento serem de grande resistência. São exemplos destes últimos: Teflon, vidro e aço inoxidável;
- ✓ A linha da base do sinal analítico para detectores eletroquímicos não sofre a influência de pulsos decorrentes das pulsações causadas por bombas peristálticas utilizadas em FIA pelo fato desta última ter sido substituída por uma do tipo pistão a qual permite uma propulsão uniforme;

As limitações que podem ser encontradas na Análise por Injeção Sequencial são (Gubeli et al, 1991).

- ✓ custo mais elevado do equipamento;
- ✓ diminuição da frequência de amostragem causada pelas etapas de enchimento da seringa e aspiração das soluções;
- ✓ otimização mais complicada do sistema visando obter a interpenetração efetiva das zonas de reagentes e amostras no caso do emprego de dois ou mais reagentes.

Apesar dessas limitações, SIA tem encontrado inúmeras aplicações, não só no controle e monitoramento de processos e análises seriais em bancada de laboratórios (Vieira dos Santos e Masini, 2010), mas também como uma ferramenta para otimização de processos, como descrito por Vieira dos Santos e Masini, 2009 e 2010b.

1.7. CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO POR INJEÇÃO SEQUENCIAL (SIC)

A realização de análises simultâneas ou de multicomponentes em sistemas de análise por injeção em fluxo ou injeção sequencial tem sido objetivo de vários grupos de pesquisa (Gomez e Callao, 2007). Na primeira década dos anos 2000 essas pesquisas se beneficiaram do acoplamento entre sistemas de fluxo de baixa pressão e fases estacionárias monolíticas (Paull e Nesterenko, 2005). Fases estacionárias monolíticas são dispositivos de separação que permitem vazão de fase móvel sob condições de pressão relativamente baixas e altas taxas de transferência de massa, sendo constituídas, entre outros, por cilindros contínuos de sílica, ou sílica modificada com octadecilsilano. Colunas monolíticas possuem estrutura bimodal de macro e mesoporos, sendo que os macroporos atuam como canais com cerca de 2 μm de diâmetro que permitem o fluxo de fase móvel sob baixas pressões. Mesoporos tem diâmetros de aproximadamente 13 nm, criando uma área superficial grande e uniforme onde os processos de adsorção ou partição ocorrem (Christian, 2003; Faria et 2006). Essa configuração permite separações eficientes serem realizadas a vazões muito mais elevadas do que aquelas usadas em colunas empacotadas, levando a significativa redução dos tempos de análise.

Huclova et al (2003) e Satinsky et al (2003), pesquisadores da república Tcheca, demonstraram que seria possível acoplar uma coluna monolítica de 25 mm de comprimento a um sistema de análise por injeção sequencial para realizar separações

cromatográficas de fármacos com perfil similar àqueles obtidos por cromatografia a líquido de alta eficiência. Os autores cunharam o termo “Sequential Injection Chromatography” para essa nova estratégia de manipulação de soluções em cromatografia a líquido.

Uma série de artigos descrevendo aplicações da cromatografia por injeção sequencial à determinação de fármacos foi publicada, sendo que uma revisão desses trabalhos foi apresentada por Chocholous et al (2007). Os autores argumentam que SIC é uma técnica em evolução e que aumenta as potencialidades dos sistemas de análise por injeção sequencial e de HPLC. Em termos comparativos, a eficiência de métodos baseados em SIC se mostrou similar à de HPLC para os mesmos tipos de colunas monolíticas. Algumas características vantajosas de SIC seriam os curtos tempos de análise, a possibilidade de fácil implantação de estratégias de derivatizações pré e pós-coluna, reduzido consumo de solventes e de geração de resíduos, o que é uma consequência da natureza descontínua do fluxo, contrariamente ao que ocorre em sistemas de HPLC. A fácil manipulação automatizada de líquidos, as dimensões reduzidas e portabilidade fazem de SIC uma técnica com maior potencial de aplicação para medidas em campo do que HPLC, especialmente para aplicações em determinações de misturas simples de 2 a 5 compostos. Por outro lado, SIC é limitado em termos de disponibilidade de colunas (limita-se a colunas monolíticas), pela baixa capacidade volumétrica das bombas de seringa (5 a 10 mL), bem como por uma menor robustez mecânica. Este último aspecto é principalmente causado por vazamentos de fase móvel pelas válvulas do sistema, decorrentes da pressão necessária para fazer fluir a fase móvel. Deve-se salientar que as colunas monolíticas foram concebidas para utilização em sistemas convencionais de HPLC a altas vazões. Assim, muito embora as pressões sejam baixas para a instrumentação típica de HPLC, essas mesmas pressões

estão próximas aos limites superiores suportados nos sistemas de injeção sequencial, causando vazamentos.

O primeiro trabalho descrevendo derivatização pré-coluna foi publicado por Rigobello-Masini et al (2008) visando a separação e determinação de aminoácidos intracelulares em microalgas marinhas. Os aminoácidos foram inicialmente convertidos nos respectivos indóis fluorescentes por reação com *o*-ftaldialdeído (OPA) na presença de 2 mercaptoetanol em tampão borato (pH 9,4) (Hanczkó e Molnar-Perl, 2003). Outro aspecto inovador desse trabalho foi a implantação de etapas discretas de eluição com concentrações de crescentes de modificador orgânico que, de um total de 18 aminoácidos em uma mistura, permitiu a separação de 14 deles com resolução maior do que 1,2, demonstrando a possibilidade de separar misturas complexas no sistema de injeção sequencial. Aplicações ambientais foram propostas pelo mesmo grupo de pesquisa, descrevendo a possibilidade de se determinar herbicidas triazínicos (simazina, atrazina e propazina) em amostras de águas com curtos tempos de análise e grande economia de solventes em comparação com HPLC usando colunas empacotadas convencionais (Santos et al, 2009). Em outro trabalho, os mesmos compostos foram determinados empregando cela de longo caminho óptico para detecção espectrofotométrica, o que possibilitou atingir limites de detecção compatíveis com os valores de concentração máximos permitidos por agência ambientais como EPA e CONAMA para águas naturais (Infante et al, 2011). Em todos esses trabalhos foi utilizado um sistema de cromatografia por injeção sequencial já designado especialmente para lidar com a pressão gerada pela coluna, com remoção da válvula da seringa (posições IN e OUT, FIGURA 1.12) comercializado pela FIALab Instruments Inc.. Mesmo assim, vazamentos foram observados após pouco tempo de uso, requerendo freqüente troca de filtros de linha ou de pré-colunas. Aperfeiçoamentos

instrumentais vêm sendo introduzidos pelo próprio fabricante visando aumentar a robustez do sistema, como será descrito posteriormente nessa tese, objetivando a determinação de glifosato e AMPA por cromatografia a líquido em fase reversa com derivatização pré-coluna.

2.0 OBJETIVOS

Essa tese teve como objetivos o desenvolvimento de metodologias de análise por injeção sequencial com detecção por voltametria e fluorescência para determinação de glifosato em diferentes tipos de amostra, tais como formulações comerciais e extratos de solo e sedimento em estudos de adsorção e dessorção. Objetivou-se também desenvolver um método de cromatografia por injeção sequencial com derivatização pré-coluna para determinação de glifosato e AMPA em amostras de águas usando detecção fluorimétrica. Finalmente, como o glifosato aplicado em solos pode atingir corpos d'água adjacentes, este trabalho tem como objetivo investigar as rotas metabólicas nas quais o glifosato atua em organismos não alvo como as microalgas, que, além de serem a base da cadeia trófica aquática, podem oferecer subsídios para compreensão da fisiologia de outros tipos de plantas que estejam sob ação de herbicidas.

Para atingir esses objetivos gerais, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Desenvolver, otimizar e aplicar método de voltametria de onda quadrada para determinar glifosato em formulações comerciais, explorando a redução do grupo N-nitroso glifosato em eletrodo de gota pendente de mercúrio, utilizando o sistema SIA para efetuar a injeção da amostra e lavagem da cela eletroquímica.
- Desenvolver método fluorimétrico para determinação de glifosato explorando as características do sistema SIA para realizar duas etapas de derivatização da amostra, convertendo o glifosato em glicina por reação com hipoclorito de cálcio e reagindo a glicina com o reagente *o*-ftaldialdeído em 2 mercaptoetanol em tampão borato pH 9,4, visando aplicar a metodologia a estudos de adsorção e dessorção.

- Desenvolver método fluorimétrico automatizado por SIA para determinação de AMPA e, no sistema de cromatografia por injeção sequencial, determinar simultaneamente glifosato e AMPA em amostras de águas a partir das condições experimentais obtidas no item anterior.
- Investigar o efeito de glifosato no crescimento e rendimento fotossintético de duas microalgas marinhas, a *Tetraselmis gracilis* (alga verde) e *Phaeodactium tricornutum* (diatomácea), procurando avaliar alterações no metabolismo de aminoácidos aromáticos intracelulares e excretados para o meio.

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 APARELHOS E REAGENTES

- Balança analítica METTLER Toledo modelo AB135-S/FACT com resolução de 0,01 mg;
- Balança semi-analítica Marte[®] com resolução de 1 mg
- Potenciostato EG&G PAR modelo 263A;
 - Eletrodo auxiliar: fio de platina;
 - Eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl saturado);
 - Eletrodo de trabalho: Gota pendente de mercúrio, modelo 303 A EG&G PAR, acoplada à cela de fluxo adaptada ao capilar;
- pHmetro Metrohm 654;
- Eletrodo combinado Mettler Toledo In lab[®] 418;
- Aparelho de injeção sequencial FIALab[®] 3500 (FIALab Instruments);
- Sistema de cromatografia por injeção sequencial SICrom[™] da FIALab Instruments;
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu LC9A com válvula de injeção Rheodyne usando alça de amostra de 20 µL, acoplado a um detector de fluorescência GBC LC-1250, controlado pelo software Class LC-10 da Shimadzu;
- Fluorímetro PMT FIALAB[®];
- Fluorímetro de clorofila de amplitude de pulso modulada (PAM – Waltz, Alemanha).
- Sistema de pré-concentração com capacidade para 12 cartuchos, Phenomenex[®];
- Incubadora com e agitação e com controle de temperatura Marconi[®] N1100;
- Bloco de digestão termostatizado Marconi[®] MA 4004;
- Bomba peristáltica Alitea XV;
- Ultrassom Retsch GmbH and Co US1;
- Desionizador Millipore Simpак[®] 1 Simplicity 185;
- Micropipetas de capacidades para 20, 100, 1000 e 5000 µL H-T modelo Labmate +;
- Glifosato Riedel-de Hæn padrão analítico;
- Ácido amino-metil fosfônico Sigma –Aldrich 99%;
- Ácido clorídrico fumegante p.a. 37% ISO Merck;
- Nitrito de sódio p.a. ACS Synth;

- Cloreto de sódio p.a. ACS ISO Merck;
- Hidróxido de sódio p.a. ACS ISO Merck;
- 2-mercaptoetanol Sigma[®];
- Tetraborato de sódio J. T. Baker;
- o-ftaldialdeído 99% Sigma;
- ácido sulfâmico p.a. ACS Synth[®];
- di-hidrogeno fosfato de sódio p.a. ACS Synth[®];
- resinas Amberlist IRA-68 Sigma e IRA 900 Cl Fluka;
- Nitrogênio ultrapuro ($O_2 < 2 \mu\text{g mL}^{-1}$) da Air Products;
- Vidraria geral de uso em laboratório.

3.2. DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE GLIFOSATO

3.2.1. Obtenção de N-nitroso glifosato

No presente trabalho utilizou-se voltametria de onda quadrada (SWV) associada à análise por injeção sequencial (SIA) para determinação do glifosato. Para proporcionar a determinação voltamétrica do glifosato foi realizada uma reação de nitrosação “off-line” do herbicida. Para isso foram usados os reagentes:

- ✓ Solução estoque de glifosato de concentração $100,0 \text{ mg L}^{-1}$;
- ✓ Solução de nitrito de sódio de concentração $72,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($5,0 \text{ g L}^{-1}$);
- ✓ Solução de ácido sulfâmico $50,0 \text{ g L}^{-1}$ (515 mmol L^{-1});
- ✓ Solução de ácido clorídrico $5,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Em balões de volumétricos de $10,0 \text{ mL}$ adicionaram-se volumes apropriados de solução estoque de glifosato de modo a gerar concentrações entre $2,5$ e $50,0 \text{ mg L}^{-1}$. Em seguida adicionaram-se $1,00 \text{ mL}$ da solução de nitrito de sódio 72 mmol L^{-1} e $2,00 \text{ mL}$ de $\text{HCl } 5,0 \text{ mol L}^{-1}$, agitando-se vigorosamente o balão. Após 15 min de reação $1,00 \text{ mL}$ de solução de ácido sulfâmico foram adicionados. Depois de cessar a evolução de nitrogênio, o que é feito em banho de ultrassom por 2 min , o volume do balão foi completado até a marca e a solução foi submetida a análise voltamétrica, utilizando o

sistema de análise por injeção sequencial para injetar a solução derivatizada na cela de fluxo adaptada ao capilar do Eletrodo de Gota Pendente de Mercúrio (EGPM).

O potenciostato utilizado permite a configuração da gota do eletrodo de mercúrio em três tamanhos de raios possíveis: (0,29, 0,36 e 0,46 mm). Neste trabalho optou-se pela de maior raio. Avaliaram-se ainda a frequência e a altura de pulso utilizando-se como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente, o de Ag/AgCl (em KCl saturado) e o de platina.

3.2.2. Condições do sistema de análise por injeção em fluxo

A metodologia empregando o sistema de análise por injeção sequencial (SIA) – Voltametria de Onda Quadrada foi desenvolvida utilizando o sistema de injeção sequencial acoplado a cela eletroquímica do potenciostato. A detecção foi feita em cela de fluxo de material acrílico adaptada ao capilar eletrodo de mercúrio, conforme proposto por Abate e colaboradores (2002). A FIGURA 3.1 mostra um esquema formado de seus componentes descritos anteriormente.

Os principais componentes do SIA utilizado consistem em uma bomba de pistão acoplada a uma seringa com capacidade máxima de 5,0 mL e uma válvula rotatória de oito portas. A seringa da bomba de pistão é conectada a uma válvula de duas vias que permite o contato da seringa com o reservatório de solução transportadora (posição In) ou com a válvula seletora rotatória (posição out). A válvula de duas vias da bomba e a válvula seletora são conectadas pela bobina coletora, confeccionada com 3 m de tubo de Teflon®, (politetrafluoroetileno-PTFE), com 0,8 mm de diâmetro interno. Ainda, a conexão da válvula rotatória com a cela de fluxo se deu a partir de um tubo também de PTFE, porém com 27 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro interno. Todos os tubos conectados às portas eram constituídos de PTFE com 0,5 mm de diâmetro interno.

Uma bomba peristáltica auxiliar (não mostrada na figura) foi mantida conectada à cela de fluxo possibilitando a retirada de todo excesso contido na mesma por aspiração.

FIGURA 3. 1: Sistema de injeção sequencial para determinação voltamétrica de glifosato previamente derivatizado a N-nitroso glifosato

A análise é iniciada acionando-se simultaneamente as programações do sistema SIA e do potenciostato, de modo que as etapas de manipulação de soluções e de aplicação de potencial ocorram de maneira sincronizada. As operações do sistema SIA se iniciam pela aspiração de 800 μL da solução transportadora ($\text{NaCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$) para o interior da seringa. Para isso a válvula da seringa deve ser comutada para a posição “IN”. Em seguida a posição da válvula da seringa é posicionada em “OUT” e a válvula seletora na porta 7, de onde são aspirados 100 μL de ar para a bobina coletora, seguindo-se a aspiração de 500 μL da solução do analito derivatizado pela porta “1” sob vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$. Durante essas operações o potenciostato mantém o circuito aberto na cela eletroquímica, ou seja, sem aplicação de potencial nos eletrodos. O sistema SIA posiciona a válvula seletora na porta “3”, sendo que a seguir a bomba de pistão injeta 400 μL da solução em direção ao detector a uma vazão de 50 $\mu\text{L s}^{-1}$, ou seja, à cela de

fluxo acoplada ao capilar do EGPM. Terminada essa operação a cela de fluxo está preenchida com solução a ser analisada, quando então o fluxo é parado por 10s, intervalo durante o qual é feita a varredura de potencial de -300 a -1200 mV vs Ag/AgCl usando a frequência de 120 Hz. Pela porta número “6” a bolha de ar contida na bobina coletora foi descartada juntamente com 500 µL de solução transportadora. O restante do volume ainda contido no interior da seringa foi enviado à cela de fluxo no intuito de se fazer a lavagem da mesma, preparando o sistema para o envio de nova amostra. As correntes de pico foram obtidas usando os recursos do software M270/250 da PAR.

3.2.3. Determinação de glifosato em formulações comerciais

Três formulações comerciais foram adquiridas em lojas de jardinagem e analisadas através do método da adição de padrão. Para isso as massas de alíquotas de 1,0 mL destas formulações foram determinadas e transferidas quantitativamente para balões volumétricos de 100,0 mL, onde foram diluídas em água desionizada até a marca. Após homogeneização, alíquotas de 30,0 µL dessas soluções foram transferidas para balões de 10,0 mL, com a posterior adição de volumes de soluções-padrão de glifosato suficientes para atingirem as concentrações deste, respectivamente iguais a 0; 5,0; 10,0 e 15,0 mg L⁻¹. Após esta etapa, procedeu-se a derivatização (item 3.2.1) e análise descrita no item 3.2.2.

3.2.4. Estudo de pré-concentração

Utilizaram-se duas resinas nesta etapa do estudo: a Amberlite IRA-68[®] de troca aniônica fracamente básica, com matriz acrílica em gel, grupos de sítios ativos de

natureza poliamínica e capacidade de troca, segundo o fabricante, de 5,6 meq g⁻¹, e a Amberlite IRA – 900 Cl[®] com suporte polimérico e capacidade de troca de aproximadamente, segundo o fabricante, 4 mmol g⁻¹. A representação dos grupos funcionais é apresentada na FIGURA 3.2.

FIGURA 3. 2: Representações das resinas IRA-68 (a) e IRA 900 Cl (b)

Antes de ser utilizada a resina Amberlite® IRA-68 foi submetida a uma lavagem com NaOH 1,0 mol L⁻¹ e em seguida neutralizada com HCl também na concentração 1,0 mol L⁻¹ (Juang et al, 1998). Após esta etapa, realizaram-se sucessivas lavagens com água desionizada. Esse processo garante a eliminação de impurezas de caráter orgânico e inorgânico. Em seguida, manteve-se a resina sob agitação, em equilíbrio com HCl 1,0 mol L⁻¹ durante 12 horas. Durante esse tempo, o grupo amino terciário da resina reage com HCl de acordo com a equação química: $R_3N + HCl \rightleftharpoons R_3NH^+Cl^-$.

Após o tempo de equilíbrio, a mesma foi seca à temperatura ambiente em um béquer de 500 mL dentro da capela do laboratório. Pesou-se 0,5 g desta e, numa seringa de um sistema de extração em fase sólida, empacotou-se a mesma cuidadosamente. Com a utilização de uma bomba peristáltica a uma vazão de 2 mL min⁻¹ enviaram-se, em etapas distintas, 1000 mL de soluções de glifosato de concentrações iniciais de 50 e 500 µg L⁻¹ (em triplicatas) e seus respectivos brancos analíticos. A passagem da solução do analito pela fase estacionária se deu pela ação da gravidade. Ao término da passagem

da amostra lavou-se cada cartucho com 5,0 mL de água desionizada para remoção de substâncias presentes na amostra não retidas na fase estacionária. Duas formas de eluição foram avaliadas: uma com 10,0 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹ e outra com 10,0 mL de solução contendo HCl e NaCl ambos a 1,0 mol L⁻¹.

A preparação da resina Resina Amberlite® IRA-900-Cl se deu da seguinte forma: secou-se uma massa suficiente da mesma a 50° C em estufa a vácuo por 2 h. Uma massa de 0,5 g desta foi colocada em seringas previamente limpas com o auxílio de água desionizada no sistema de extração em fase sólida tomando-se cuidados para obter “empacotamento” adequado, isto é, sem espaços contendo ar para não permitir a formação dos indesejados “caminhos preferenciais” quando se desse a passagem da solução de amostra. Com o auxílio da bomba peristáltica, enviaram-se por diferentes tubos – um para cada cartucho – sob vazão de 2 mL min⁻¹, 100 mL de solução de glifosato (em triplicata) de concentração inicial de 0,6 mg L⁻¹, além de água desionizada em um dos cartuchos para avaliação do “branco” da análise. Após esta etapa, lavou-se cada cartucho com 5,0 mL de água desionizada. Finalmente procedeu-se a eluição com 15,0 mL de solução de NaCl 1,0 mol L⁻¹, coletando-se os eluatos em tubos de vidro com tampa.

Volumes de 7,5 mL dos eluatos das duas resinas foram dispensados em balões volumétricos com 10,0 mL de capacidade procedendo-se a derivatização com nitrito de sódio, ácido clorídrico e ácido sulfâmico, conforme descrito no item 3.2.1. O processo de análise se deu por batelada.

3.3. DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE GLIFOSATO E AMPA UTILIZANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL

3.3.1. Reagentes e soluções

- ✓ Solução transportadora:

A partir da diluição de uma solução-padrão $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KH_2PO_4 prepararam-se 250 mL de solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com ajuste para o pH 6,0 com solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ controlando-se o pH com um eletrodo combinado de vidro previamente calibrado.

- ✓ Hipoclorito de cálcio:

Através da diluição de volumes adequados de soluções-estoque, preparou-se uma solução de concentração $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de hipoclorito de cálcio em KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ num balão de 10,0 mL, armazenando-se a mesma em um recipiente plástico com 15 mL de capacidade.

- ✓ *o*-ftaldialdeído/mercaptoetanol (OPA-MCE):

Colocaram-se 10,0 mg de *o*-ftaldialdeído em um béquer de 10,0 mL no qual se adicionou 1,0 mL de metanol seguidos de 10,0 μL de 2 mercaptoetanol (OPA-MCE). Posteriormente, adicionou-se o conteúdo do béquer a um balão de 100 mL e completou-se o volume até a marca de referência do mesmo com uma solução de tetraborato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0.

Após a homogeneização do sistema, verteu-se a solução num frasco de vidro âmbar, no qual se borbulhou nitrogênio por alguns minutos, fechou-se o frasco e armazenou-se o mesmo sob refrigeração. O preparo desta solução foi semanal buscando-se seguir as recomendações descritas no método 547 da EPA referentes ao prazo de validade.

3.3.2. Procedimento de Análise por Injeção Sequencial

A FIGURA 3.3 mostra o acoplamento do aparelho de Análise por Injeção Sequencial (SIA) ao fluorímetro, ao bloco de digestão com aquecimento termostático e a disposição das soluções empregadas no sistema de análise adotado em suas respectivas portas.

FIGURA 3. 3: Configuração do sistema SIA para determinação fluorimétrica de glifosato e AMPA. Bobina coletora feita com tubo de Teflon de 3 m x 0,8 mm d.i.; RV = válvula rotatória seletora de 8 portas; Bobina de reação 1 feita com tubo de Teflon de 80 cm x 0,8 mm d.i., aquecida a $(48,0 \pm 0,5^0\text{C})$; Bobina de reação 2 feita com tubo de Teflon de 1 m x 0,8 mm d.i.; Solução transportadora = $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,010 mol L^{-1} (pH 6.0); OCl^- = solução 30 mg L^{-1} de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ em KH_2PO_4 0,010 mol L^{-1} (pH 6,0); OPA-MCE = solução 100 mg L^{-1} de *o*-ftaldialdeído na presença de 2-mercaptoetanol em tampão borato 0,050 mol L^{-1} (pH 9,4).

O procedimento de análise por injeção sequencial para a determinação de glifosato é descrito em detalhe na TABELA 3.1. Componentes descritos na TABELA 3.1 são os mesmos que os mostrados na FIGURA 3.3. Primeiro, o sistema preenche a seringa, a bobina coletora e as bobinas de reação 1 e 2, além da célula de fluxo com a solução transportadora (Tampão KH_2PO_4 0,010 mol L^{-1} , pH 6,0), seguido de limpeza da linha de amostragem conectada à porta 1 da válvula rotatória seletora (RV) com amostra representativa das solução a ser analisada. Tubos conectando as portas 2 e 8 de RV são preenchidos com as respectivas soluções de reagentes OCI^- e OPA- MCE. A porta 7 é aberta para o ar. O procedimento descrito na TABELA 3.1 pode ser resumido da seguinte forma: **Etapas 1-3**: preparar o sistema para iniciar a análise através do preenchimento da seringa com a solução transportadora (**Etapa 1**) e a linha de amostragem (**Etapa 2**) com a solução a ser analisada, descartando o excesso de amostra (que entra na bobina coletora) através da porta 4 (**Etapa 3**). Em seguida, um monossegmento é formado por aspiração sequencial de 400 μL amostra e 100 μL do reagente OCI^- dentro da bobina coletora (**Etapas 4-6**). Para assegurar a interpenetração eficiente das zonas de amostra e de reagente no monossegmento, os volumes totais foram fragmentados 4 vezes (4 x 100 μL de amostra e 4 x 25 μL de reagente de OCI^-). O monossegmento é injetado na bobina de reação 1 aquecida a 48⁰C, onde o fluxo é interrompido por 15 s (**Etapas 7 e 8**), para permitir a conversão de glifosato em glicina. A bolha de ar mais perto de RV e a porção solução que não entra na parte aquecida da bobina de reação 1 é descartada através da porta 4 de RV (**Etapa 9**). Em seguida, a zona de reação contendo glicina é intercalada entre duas zonas do reagente OPA-MCE (**Etapa 10**) e a zona de reação é injetada em direção ao detector de fluorescência através da porta 6 de RV (**Etapa 11**). Finalmente, o sistema limpa a bobina de reação 1 com a solução transportadora (**Etapa 12**), antes de começar uma nova análise.

TABELA 3. 1: Sequência de etapas da programação do SIA para a derivatização do glifosato

etapa	componente	comando	parâmetro	Ação/Comentário
1	Válvula seringa (SV)	IN		Preenchimento da bomba-pistão com solução-transportadora
	bomba-pistão	Vazão	200 $\mu\text{L s}^{-1}$	
	bomba-pistão	Aspiração	2700 μL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
2	SV	OUT		Preenchimento da linha de amostragem com amostra/padrão
	Válvula seletora (RV)	Porta 1 (analito/Padrão)		
	bomba-pistão	Aspiração	100 μL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
3	RV	Porta 4 (descarte)		Descartando o excesso de amostra da bobina coletora
	bomba-pistão	Dispensa	200 μL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
4	RV	Porta 7		Injetando uma bolha de ar na bobina coletora para formar um monossegmento
	bomba-pistão	Vazão	50 $\mu\text{L s}^{-1}$	
	bomba-pistão	Aspiração	50 μL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
Loop: Número de repetições: 4				
5	RV	Porta 1 (analito/Padrão)		formação do monossegmento com 4 zonas de reagente e 4 zonas de amostra
	bomba-pistão	Vazão	50 $\mu\text{L s}^{-1}$	
	bomba-pistão	Aspiração	100 μL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
	RV	Porta 2 (Reagente ClO^{-1})		
	bomba-pistão	Aspiração	25 μL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
Fim da repetição				
6	RV	Porta 7		Injetando outra bolha de ar na bobina coletora para formar o
	bomba-pistão	Aspiração	50 μL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da		

operação				monossegmento
7	RV	Porta 3 (reator 1)		Injetando o monossegmento ao reator 1 (48° C)
	bomba-pistão	Dispensa	600 µL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
8	bomba-pistão	Espera	15 s	Parada de fluxo no reator 1
9	bomba-pistão	Aspiração	300 µL	Descarte de uma bolha de ar do monossegmento e da zona de reação que não estava no reator aquecido
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
	RV	Porta 4 (descarte)		
	bomba-pistão	Vazão	100 µL s ⁻¹	
	bomba-pistão	Dispensa	400 µL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
10	RV	Porta 8 (OPA-MCE)		Aspira OPA-MCE para a bobina coletora
	bomba-pistão	Aspiração	100 µL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
	RV	Porta 3 (Reator 1)		Aspiração da zona de reação do reator 1 para a bobina coletora
	bomba-pistão	Aspiração	200 µL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
	RV	Porta 8 (OPA-MCE)		Intercalando a glicina entre volumes de OPA-MCE dentro da bobina coletora
	bomba-pistão	Aspiração	100 µL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		
11	fotomultiplicadora	aciona aquisição de dados		Início da aquisição de dados do detector
	RV	Porta 6 (reator 2)		Injeção da mistura reacional ao detector pelo reator 2
	bomba-pistão	Vazão	40 µL s ⁻¹	
	bomba-pistão	Dispensa	1200 µL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		Lavagem da bobina coletora, reator 2 e detector com solução transportadora
	bomba-pistão	Vazão	200 µL s ⁻¹	
	bomba-pistão	Esvaziar		
	bomba-pistão	Espera até o fim da operação		Fim de aquisição de dados
	fotomultiplicadora	Término do funcionamento		
12	SV	IN		Limpeza do reator 1 com solução transportadora preparando o
	bomba-pistão	Vazão	200 µL s ⁻¹	
	bomba-pistão	Aspiração	700 µL	
	bomba-pistão	Espera até o fim da		

operação		sistema para uma nova análise
SV	OUT	
RV	Porta 3 (Reator 1)	
bomba-pistão	Esvazia seringa	
bomba-pistão	Espera até o fim da operação	

Na determinação de AMPA a reação com hipoclorito não é necessária, de modo que o procedimento limita-se a aspirar a solução da amostra entre duas zonas de reagente OPA-MCE.

3.3.3. Amostras de água

Duas amostras de água de nascentes foram coletadas, uma localizada no Parque da Vila dos Remédios e a outra no Parque do Jaraguá, ambas no Estado de São Paulo em sua capital. Uma amostra de água potável foi coletada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, uma coletada do serviço de abastecimento público da região da zona Oeste da capital paulista e finalmente uma amostragem foi realizada em um poço artesiano na cidade de Osasco, Vila dos Remédios, também no Estado de São Paulo. Todas as amostras foram filtradas no sistema de filtração a vácuo em membrana celulósica com porosidade 0,2 μm , armazenadas em frascos plástico e estocadas sob refrigeração a 4 °C.

Para os ensaios de adição e recuperação colocaram-se em balões de capacidade para 10,0 mL, 9,0 mL das amostras previamente filtradas completando-se o volume com volumes apropriados de solução estoque de glifosato ou AMPA e água desionizada de modo que a concentração final nesses balões fosse 0,25; 2,5 ou 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A quantificação foi feita por calibração externa usando soluções padrões preparadas em água desionizada. O processo de análise se deu conforme descrito em 3.3.2 com a utilização de uma solução-transportadora de KH_2PO_4 0,01 mol L^{-1} em pH 6,0.

3.3.4 Estudos de adsorção e dessorção de glifosato em solo e sedimento de rio

3.3.4.1 Amostras de solo e sedimento

A amostra de solo foi coletada na fazenda experimental da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) no município de Piracicaba, Estado de São Paulo, numa área sem o histórico de aplicação de herbicidas. A amostragem e o tratamento de solo são descritas por Abate e colaboradores (Abate et al, 2004). Brevemente pode ser descrito como rico em argila (53%), silte (18%) e areia (29%) com um conteúdo de carbono orgânico total de 1,58% (m m^{-1}) e o pH da suspensão obtida foi de 5,5. Uma amostra de sedimento foi coletada com uma draga Birge-Eckman no Reservatório de Barra Bonita no Rio Tietê a qual foi seca e estudada sem tratamento prévio. Este sedimento é predominantemente constituído por areia (47%), silte (19%), argila (34%), contendo 1,8% (m m^{-1}) de carbono orgânico total e pH 6,7.

3.3.4.2 Construção das isotermas de adsorção

Foram preparadas suspensões numa razão de 200 mg ($\pm 0,1$ mg) de sedimento para 10,00 mL de solução de glifosato nas concentrações de 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 160,0 e 320,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água desionizada em oito tubos Corning® de polipropileno para centrífuga com capacidade de 15 mL. Em seguida, os mesmos foram fechados e agitados por 24 h em 250 r.p.m. num agitador horizontal termostatizado ($25,0 \pm 0,50$) °C. Após o tempo de contato as suspensões foram centrifugadas a $1000 \times g$ por 15 minutos e 9,0 mL da solução sobrenadante foram filtrados em membranas de acetato de celulose de 0,20 μm e analisadas pelo método SIA após a diluição apropriada. Para estudar a dessorção, nos tubos utilizados para o estudo de adsorção foram colocados 9,0

mL de água desionizada seguidos de agitação por 24 h em 250 r.p.m. num agitador horizontal a $(25,0 \pm 0,5)$ °C. Após o tempo de contato as suspensões foram centrifugadas por 15 minutos e a solução sobrenadante resultante foi filtrada em membranas de acetato de celulose de 0,20 µm e analisadas pelo método SIA descrito na TABELA 3.1.

No intuito de se corrigir os efeitos de matriz, usaram-se soluções preparadas na matriz da amostra. Para preparar os padrões na solução da matriz, usou-se uma massa de 2,0 g (± 1 mg) de amostra (solo ou sedimento), a qual foi agitada em 100 mL de água desionizada a 250 r.p.m. por 24 h em $(25,0 \pm 0,50)$ °C em dois tubos Corning® de polipropileno para centrífuga de 50 mL. Após esta etapa as suspensões foram centrifugadas e filtradas sob os mesmos critérios adotados descritos no parágrafo anterior. Alíquotas de 9,0 mL dos extratos foram transferidos para balões volumétricos de 10,0 mL. Antes de se completar o volume com água desionizada, volumes apropriados de solução estoque de glifosato foram adicionados de modo a gerar concentrações de 0; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µmol L⁻¹ após completar-se o volume até 10,0 mL. Essas soluções foram usadas para construção das curvas analíticas seguindo o procedimento descrito na TABELA 3.1.

3.4. DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO POR INJEÇÃO SEQUENCIAL

3.4.1. Materiais

As soluções de hipoclorito de cálcio e OPA-MCE foram preparadas conforme descrito anteriormente na seção 3.3. A solução transportadora, que agora tem o papel de fase móvel foi composta de solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ em pH 7,2 ou 6,8 preparado a partir do sal KH₂PO₄, ajustando-se o pH da solução (monitorado com

eletrodo de vidro combinado previamente calibrado) por adição gota a gota de solução de KOH 1,0 mol L⁻¹. Antes de completar o volume, adicionou-se o volume apropriado de metanol grau HPLC (J.T. Baker) de modo a se obter a solução final com 20 ou 25% (v v⁻¹) do modificador orgânico. As soluções de fase móvel foram filtradas em membrana de 0,45 µm, e desaeradas em ultrassom por pelo menos 30 min antes do uso. Todas as soluções foram preparadas com água destilada e desionizada a resistividade > 18 MΩ cm.

3.4.2. Equipamento de Cromatografia por Injeção Sequencial

O sistema de cromatografia a líquido por injeção sequencial é esquematizado na FIGURA 3.4, sendo comercializado pela FIALab Instruments Inc. (Bellevue, WA, EUA) com o nome SICromTM. No esquema da Fig 3.4, VS é uma válvula seletora rotatória de 10 portas com capacidade para suportar pressões de até 5000 psi, construída em aço inoxidável, fornecido pela Valco Instruments (Houston, TX, EUA). A bomba de pistão modelo PDP S17 é fornecida pela Sapphire EngineeringTM (Pocasset, MA, EUA) e tem capacidade de 4000 µL (volume do reservatório de FM₁). O corpo da bomba e seu interior, que fica em contato com a fase móvel, é construído em ULTEM[®]. A bomba tem um pistão (embolo) de cerâmica para a propulsão e aspiração de solução. Uma porta frontal na parte superior do corpo da bomba conecta o reservatório de solvente com a porta central da VS através da bobina coletora, que é feita de 4 m de tubo de Teflon com 0,8 mm de diâmetro interno (capacidade de 2000 mL). Uma porta na parte superior traseira no corpo da bomba está ligada ao frasco de solvente (FM₁) através de uma “check-valve” (CV) e uma válvula solenóide de 2-vias (FIGURA 3.3). Uma porta adicional na parte traseira inferior do corpo da bomba é conectada, através de uma válvula de 4 vias, a uma válvula de alívio (VA) da Up-Church Científic (Oak Harbor,

WA, EUA) que se abre a uma pressão > 1000 psi. A porta 10 de VS está conectada a um filtro de linha com 10 µm de porosidade, que por sua vez se conecta a uma coluna guarda monolítica C₁₈ de 5 mm de comprimento por 4,3 mm de diâmetro e a uma coluna monolítica de fase reversa C₁₈ Chromolith Flash de 25 mm de comprimento por 4,3 mm, ambas da Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha). A saída da coluna é conectada ao detector de fluorescência PMT-FL da FIALab Instruments, que usa um LED de emissão de comprimento de onda de 340 nm e um filtro de interferência para selecionar a emissão em 450 nm. As conexões da porta 10 de VS até a entrada da cela de fluxo é feita com tubo de PEEK (polímero de polietere tercetona) com 0,25 mm de diâmetro interno. Todas as outras conexões são feitas com tubos de Teflon de 0,5 mm de diâmetro interno. Os movimentos da bomba e das válvulas (VS e 2-vias) são sincronizados com a aquisição de dados do detector, sendo controladas pelo software FIALab5.0 for Windows.

FIGURA 3. 4: Sistema SICrom™ de cromatografia a liquido por injeção seqüencial com válvula seletora (VS) de alta pressão (5000 psi) acoplada na bomba de pistão (capacidade de 4,0 mL e pressões de até 1000 psi) pela bobina coletora. A conexão da bomba com a Fase Móvel (FM₁) é feita através de uma check-valve (CV) e uma válvula de duas vias. O reagente hipoclorito de cálcio (OCI⁻) de concentração 30 mg L⁻¹ em KH₂PO₄ 0,010 mol L⁻¹ (pH 6,0) é conectado à porta 2 da VS, enquanto na porta 3 é conectado o reagente OPA-MCE, constituído de solução de *o*-ftaldialdeído 100 mg L⁻¹ na presença de 2-mercaptoetanol 0,050 mol L⁻¹ em tampão borato 0,05 mol L⁻¹ (pH 9,4). Retângulos pretos representam que as portas de SV estão fechadas com tubo de Teflon sólido. A composição da fase móvel (FM₁) é metanol:tampão fosfato 0,010 mol L⁻¹ (pH 6,8) na proporção 25:75 (v v⁻¹).

O funcionamento do equipamento esquematizado na FIGURA 3.4 é resumidamente descrito como:

1. Para preencher o reservatório da bomba (ou seringa) com a fase móvel (FM₁):

Seleciona-se a porta 9 de VS, fechada com Teflon sólido, e a válvula de 2-vias é ligada (posição “on”). Ao se enviar o comando de encher a seringa, o êmbolo do pistão retrai e a solução do frasco de fase móvel (FM₁) entra no reservatório através da válvula de 2-vias e da check-valve.

2. Aspirar amostra ou reagentes na bobina coletora:

A válvula de 2-vias é desligada (posição “off”), de modo que para aspirar soluções para o interior da bobina coletora, aciona-se a porta desejada de VS e envia-se o comando de aspiração para a bomba. Como a válvula de 2-vias na posição “off” fecha o contato com o frasco de fase móvel (FM₁), essa não é aspirada para o interior do reservatório da bomba.

3. Injeção de amostra e fase móvel em reatores ou coluna

Seleciona-se a porta desejada e envia-se o comando de injetar um determinado volume a uma determinada vazão. Quando se deseja fazer a separação cromatográfica, injeta-se a amostra ou zona de reação na coluna; durante essa etapa a pressão aumenta, mas a check-valve (CV) impede que a solução de fase móvel retorne ao frasco de origem (a válvula de 2-vias nesse caso não resistiria à pressão). Na eventualidade de um aumento de pressão a valores > 1000 psi, a fase móvel é desviada para uma válvula de alívio (VA) acoplada ao corpo da bomba.

3.4.3. Procedimento para efetuar as etapas para derivatização e separação de glifosato e AMPA no sistema SICromTM

Preenchimento do reservatório da bomba com a fase móvel: Seleciona-se a porta 9 de VS, aciona-se a válvula de 2-vias (on) e aspira-se 3800 µL de FM₁ a 150 µL s⁻¹.

Limpeza da linha de amostragem com solução representativa da amostra: Seleciona-se a porta 1 de VS, desliga-se a válvula de 2-vias e aspira-se 200 μL a 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ de amostra para o interior da bobina coletora.

Descarte do excesso de amostra na bobina coletora: Seleciona-se a porta 7 (descarte) e dispensa-se 500 μL a 200 $\mu\text{L s}^{-1}$, incluindo aí o excesso de amostra e fase móvel.

Reação de glifosato com hipoclorito de cálcio para conversão de glifosato em glicina:

Através das portas 1 e 2 aspira-se sequencialmente 100 μL de amostra e 25 μL da solução OCI^- , respectivamente, a uma vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$. O procedimento é repetido quatro vezes de modo que os volumes totais de amostra e reagente aspirados para a bobina coletora completam, respectivamente, 400 e 100 μL , intercalando-se as zonas no sentido de obter maior interpenetração entre elas (Colombo e Masini, 2011, Vieira et al, 1998). Em seguida, reverte-se a direção do fluxo e injetam-se 500 μL de solução na bobina de reação aquecida a 48⁰C a uma vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$, onde o fluxo é parado por um intervalo de tempo suficiente para a realização da análise de AMPA, que será descrita a seguir. Salienta-se que em todas essas operações a aspiração (ou injeção) de uma solução só se inicia após o término da operação de processamento da solução anterior, evitando assim a entrada de ar, ou drásticas variações de pressão que podem ocorrer devido a mudanças de posição da válvula seletora simultâneas a movimentos da bomba.

Derivatização e análise de AMPA: A porta 3 é selecionada e 20 μL de solução de OPA-MCE são aspirados na bobina coletora, seguidos de 60 μL de amostra (porta 1) e mais 20 μL de OPA-MCE (porta 3), sempre à vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$. Em seguida aciona-se a aquisição de dados do detector de fluorescência, VS é posicionada na porta 10 e

bombeia-se a zona de reação através coluna e detector com 2500 μL de FM_1 a uma vazão de 20 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Preenchimento do reservatório da bomba: Seleciona-se a porta 9 de VS, liga-se a válvula de duas vias (on) e aspira-se 2600 μL de FM_1 a 150 $\mu\text{L s}^{-1}$. Após o final da operação a válvula de 2-vias é desligada.

Descarte da zona de reação situada entre a porta 4 de VS e a região aquecida do reator auxiliar: A porta 4 de VS é selecionada e 300 μL da zona de reação contida na bobina de reação auxiliar (especificamente o volume de solução que não está na região aquecida do reator) são aspirados de volta para a bobina coletora e então descartados, dispensando-se 400 μL através da porta 7 a uma vazão de 150 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Determinação de glifosato: Através das portas 3 e 4 de VS aspira-se sequencialmente 40 μL de OPA-MCE e 20 μL de solução de glicina (produto da reação entre glifosato e hipoclorito no reator aquecido) a uma vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$, repetindo-se a sequência mais três vezes, completando um volume total de 160 μL de OPA-MCE e 80 μL de amostra, intercalados em quatro frações, facilitando a interpenetração das zonas. Em seguida VS é posicionada na porta 10 e o conteúdo do reservatório da bomba é esvaziado a uma vazão de 20 $\mu\text{L s}^{-1}$, injetando-se a zona de reação através da coluna e do detector. Ao final da etapa a aquisição de dados é desligada.

Lavagem da bobina de reação auxiliar: Para finalizar a análise, 1000 μL de fase móvel são aspirados no reservatório da bomba (porta 9, válvula de 2-vias ligada) que é então esvaziado através da porta 4 de VS (válvula 2-vias desligada) eliminando os resíduos da zona de reação contidos na bobina de reação auxiliar, deixando o sistema pronto para iniciar uma nova análise.

3.5. EFEITO DE GLIFOSATO EM CULTIVOS DE MICROALGAS

Cultivo das algas- As algas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* originalmente do banco de algas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, com clones mantidos em nosso laboratório, foram cultivados em câmara de cultivo Marconi a 20 °C, com fotoperíodo 12 horas claro e 12 escuro. As algas foram inoculadas em água do mar autoclavada contendo meio de Guillard-Ryther (1962) e aeradas com ar atmosférico num balão de 6 litros. A partir do quinto dia de cultivo, quando as algas estavam em fase exponencial do crescimento, o cultivo foi dividido em cinco balões contendo 500 ml cada. Um balão foi usado como controle e aos quatro restantes foi adicionado glifosato em concentrações que variavam entre 2 mg L⁻¹ e 1000 mg L⁻¹. Esses cultivos foram mantidos na câmara durante cinco dias, sem aeração, durante os quais as amostras eram coletadas para análises.

Contagem de células – Um pequeno volume de cultivo foi coletado e corado com lugol. As células foram contadas no microscópio ótico em câmara do tipo hemocítômetro Fuchs-Rosenthal.

Medidas de fluorescência da fotossíntese – Parâmetros relacionados à fluorescência da fotossíntese foram avaliados usando um fluorímetro de amplitude de pulso modulada (PAM – Waltz, Germany). Os cultivos foram diluídos até que medidas adequadas de fluorescência fossem obtidas

Medidas de pH- O pH foi medido nos cultivos assim que esses eram retirados da câmara de cultivo

Determinação da Concentração de Aminoácidos- Um volume de 100 ml de cultivo foi coletado e filtrado em membranas de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,45µm, usando uma membrana para cada 20 ml de cultivo. O filtrado e as membranas

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposta de determinação voltamétrica de glifosato por voltametria de onda quadrada baseou-se em uma etapa inicial de derivatização do grupo amino secundário por nitrito em meio ácido, com formação de uma nitrosamina (grupo N-nitroso) de glifosato, como mostra a reação 4.1.

O grupo N-nitroso é facilmente reduzido em eletrodo de mercúrio (Franklin Smyth et al (1975) (reação 4.3), uma propriedade que vem sendo explorada para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de glifosato, como descrito por Bronstad e Friestad (Bronstad e Friestad, 1976) usando polarografia de pulso diferencial e, mais recentemente, por Teófilo et al (2004) usando voltametria de onda quadrada em eletrodo de gota pendente de Hg.

Um voltamograma de onda quadrada do N-nitroso glifosato é apresentado na FIGURA 4.1, mostrando a natureza irreversível do processo, uma vez que tanto a corrente da medida direta, quanto da medida reversa apresentam o mesmo sinal. Para sistemas irreversíveis o ganho de sensibilidade fornecido pelas medidas de onda quadrada não são tão significativos quanto para sistemas reversíveis, de modo que no presente caso, a maior vantagem dessa técnica em comparação com, por exemplo, voltametria de pulso diferencial, é a possibilidade de se obter correntes de pico bem definidas em experimentos executados em alta velocidade de varredura, aumentando a frequência de amostragem. Além disto, a corrente faradaica pode ser coletada em um intervalo de tempo adequado, maximizando sua contribuição em relação à corrente capacitiva.

FIGURA 4. 1: Voltamograma de onda quadrada de uma solução de N-nitroso glifosato decomposto em suas componentes de corrente direta, corrente reversa e a corrente líquida, resultante da diferença entre as correntes dos voltamogramas direto e reverso com Frequência: 120 Hz e Altura de Pulso: 25 mV

No presente trabalho tentou-se em uma primeira etapa automatizar a execução das reações 4.1 e 4.2 em sistema de injeção sequencial usando uma câmara de mistura para homogeneização do meio reacional (Vieira dos Santos et al, 2011), mas essa estratégia não se mostrou viável, pois a reação 4.1 é lenta (cerca de 15 min) e a eliminação do excesso de nitrito com ácido sulfâmico (reação 4.2) gera grande volume de N_2 e, portanto, muitas bolhas, inviabilizando a detecção voltamétrica (reação 4.3) em fluxo. Devido a essas dificuldades optou-se para executar as reações 4.1 e 4.2 em batelada e utilizar o sistema de injeção sequencial acoplado ao capilar do eletrodo de Hg para efetuar a injeção da solução de N-nitroso glifosato na cela de detecção. Para isso alguns parâmetros como vazão de envio da zona de amostra para a cela de fluxo e frequência de onda quadrada foram estudados. Os melhores resultados foram obtidos

injetando-se 400 μL da zona de amostra e parando-se o fluxo no momento de executar a varredura de potencial de -0,4 a -1,2 V vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}). Esse volume foi definido a partir de estudos anteriores (dos Santos et al, 2005) os quais mostraram que, nessas condições, o coeficiente de dispersão da zona de amostra no elemento de fluido em contato com a gota de Hg tende a 1, ou seja, aproxima-se a composição da amostra pura (derivatizada).

O efeito da frequência de onda quadrada também foi avaliado, conforme mostra a FIGURA 4.2, na qual se observa um patamar de valores máximos de corrente de pico entre 80 e 120 Hz, sendo esse último valor adotado na continuidade dos estudos. Para reações totalmente irreversíveis a corrente de pico obedece uma relação linear com a frequência de pulsos (Souza et al, 2003), o que foi observado até 80 Hz. O patamar de corrente bem como o decréscimo das magnitudes de corrente para frequências maiores do que 120 Hz podem estar relacionados com limitações da cinética de transferência de elétrons em altas velocidades de varredura. Teófilo e colaboradores (2004) encontraram um valor ótimo de frequência em 70 Hz, o que é consistente com os valores obtidos no presente experimento.

FIGURA 4. 2: Influência da frequência de onda quadrada na corrente de pico de redução de uma solução de N-nitroso glifosato obtida a partir de uma solução 10 mg L^{-1} de glifosato. Condições experimentais: fluxo parado, altura de pulso 25 mV , meio de $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

4.1.1 Figuras de mérito

A FIGURA 4.3 mostra os voltamogramas de soluções de N-nitroso glifosato em eletrodo de Hg usados para a construção de uma curva analítica.

FIGURA 4. 3: Voltamogramas de soluções de N-nitroso glifosato em HCl 1,0 mol L⁻¹ usados para construção de uma curva analítica obtidos a partir de soluções de glifosato de concentração (a) branco, (b) 2,5 (c) 10,0 (d) 15,0 (e) 25,0 e (f) 50,0 mg L⁻¹. Frequência de onda quadrada: 120 Hz; Altura de Pulso = 25 mV. A inserção mostra a relação linear entre as correntes de pico e a concentração de glifosato

A equação de uma curva analítica típica é $I_p = (-0,099 \pm 0,001)C_{\text{glifosato}} + (0,31 \pm 0,03)$, com $R^2 = 0,9995$, com I_p expresso em μA e concentração de glifosato ($C_{\text{glifosato}}$) em mg L^{-1} . Curvas analíticas obtidas em diferentes dias de trabalho têm suas equações mostradas na TABELA 4.1, a partir da qual se pode calcular o desvio-padrão relativo das sensibilidades que correspondeu a 5,4%. O desvio padrão relativo de dez medidas de corrente de pico obtidas com soluções 2,5 e 50 mg L^{-1} foi de 12 e 4%, respectivamente

TABELA 4. 1: Equações das curvas de calibração, coeficientes de correlação das curvas analíticas, limites de detecção e quantificação (mg L⁻¹)

data	Equação	R ²	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
06/03/08	y = -0,0977x -0,0683	0,9992	0,78	2,6
03/06/08	y = -0,0929x -0,0121	0,9996	0,73	2,4
07/03/08	y = -0,1035x -0,0194	0,9996	0,73	2,4

Para a derivatização foram utilizados 5 µg de NaNO₂, 36,4 mg de HCl, 50 µg de ácido sulfâmico e 0,0468 g de NaCl sendo que para a obtenção de cada sinal analítico foram necessários 500 µL da solução contendo a amostra derivatizada de forma “off-line”. O método permite uma frequência de amostragem correspondente a 75 determinações por hora, devendo-se salientar que esse valor se refere apenas à etapa de determinação voltamétrica desconsiderando as de extração e concentração, assim como a reação de nitrosação, as quais por sua vez, conforme já mencionado, foram realizadas “off-line”.

Para uma faixa de resposta linear entre 2,5 a 50,0 mg L⁻¹, o limite de detecção calculado pela relação $3\sigma_{10}/S$, (onde σ_{10} = desvio-padrão do branco obtido após dez medidas e S é o coeficiente angular da curva analítica), foi igual a 0,7 mg L⁻¹. O limite de quantificação (LQ = $10\sigma_{15}/S$) conseguido foi de 2,4 mg L⁻¹.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) estabelece limite de 700 µg/L de glifosato em água potável, mas a Comunidade Econômica Européia (EEC) estabelece como “concentração máxima admissível” para pesticidas em água potável, como substâncias individuais, o limite de 0,1 µg L⁻¹, desde que a concentração total de pesticidas não ultrapasse 0,5 µg L⁻¹ (International Association of Environmental Analytical Chemistry, 1994; Amarante Jr., et al, 2002). No Brasil, o

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece um valor de $65 \mu\text{g L}^{-1}$ como valor máximo permitido para águas doces. Como os valores de limite de detecção e de quantificação do método proposto estão acima de todos os valores máximos permitidos, optou-se por investigar a implantação de uma etapa de pré-concentração em resinas de troca iônica.

4.1.2. Etapa de pré-concentração/mudança de matriz

Como descrito na Parte Experimental (item 3.2.4), foram investigadas as resinas Amberlite® IRA-68 e IRA-900 Cl ambas da marca Sigma® disponíveis no laboratório. Os resultados de taxas de recuperação são mostrados na TABELA 4.2, para diferentes condições de extração.

TABELA 4. 2: Taxas de recuperação (%) de glifosato sob diferentes condições de extração em duas resinas de troca iônica para uma concentração inicial de glifosato de 50 ou 500 $\mu\text{g L}^{-1}$

Concentração inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amberlist IRA-68		IRA-900 Cl
	Eluente		
	10,0 mL de NaCl 1,0 mol L ⁻¹	10 mL de mistura de HCl e NaCl, ambos 1,0 mol L ⁻¹	15,0 mL de NaCl 1,0 mol L ⁻¹
50	41	106	-
500	46	73	-
50	-	-	112 ± 2

Nota-se que com a resina Amberlist IRA-68, utilizando-se 10,0 mL de solução eluente composta por ácido clorídrico e cloreto de sódio, ambos na concentração 1,0 mol L⁻¹, a porcentagem de recuperação foi a mais próxima a 100 % entre as diferentes

condições estudadas para uma solução de glifosato inicialmente a $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Já para a solução de glifosato $500 \mu\text{g L}^{-1}$ os valores de recuperação foram menores (46 e 73%), o que pode ser explicado por um volume insuficiente da solução do eluente utilizado para liberar o analito da resina.

Para a resina Amberlist IRA-900 Cl observa-se que com 15,0 mL de NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ a recuperação foi satisfatória mostrando que o volume utilizado é suficiente para a eluição do analito. Dados obtidos por Corbera e colaboradores (2006) mostram que para concentrações de 0,3, 1,0 e $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$, as porcentagens de recuperação para essa mesma resina e condições de eluição foram, respectivamente, iguais a 108, 99 e 96 %. Desta forma, o presente trabalho mostra uma porcentagem de recuperação próxima das obtidas por estes autores. Deve-se salientar que no trabalho de Corbera et al (2006) a determinação de glifosato foi feita por cromatografia a líquido com detecção por fluorescência, que é uma técnica reconhecidamente mais sensível do que esta sendo proposta.

Os resultados obtidos sugeriram que a etapa de pré-concentração por troca iônica permitiria a aplicação do método para monitorar as concentrações de glifosato em águas, atendendo aos limites máximos permitidos pelo CONAMA e pela EPA. Entretanto, algumas aplicações a amostras de águas naturais enriquecidas com concentrações conhecidas de glifosato apresentaram baixas taxas de recuperação.

4.1.3 Interferências

Tentando entender as baixas taxas de recuperação obtidas em amostras reais, efetuou-se uma avaliação de possíveis interferentes, sem passar a amostra pela coluna de troca iônica, conforme mostrado na TABELA 4.3.

Pode-se observar que o ácido aminometilfosfônico (AMPA), o principal metabólito do glifosato não apresentou interferência significativa. Paraquat, uréia e hidroxiatrazina, apresentaram erros relativos menores do que 10%. O ácido fúlvico provocou erros negativos e positivos em diferentes concentrações, enquanto ácido húmico provocou resultados sistematicamente negativos, o que pode ser explicado por fenômenos de adsorção e passivação da superfície do eletrodo de Hg. Já os outros herbicidas, tais como diquat, picloram, atrazina e os metabólitos da atrazina apresentaram forte interferência positiva pelo fato de serem eletroativos, sofrendo reação de redução no eletrodo de Hg em potenciais próximos aos do N-nitroso glifosato (Santos et al, 2004; Santos e Masini, 2007, Souza et al, 2004).

TABELA 4. 3: Efeito de alguns constituintes da matéria orgânica natural de águas (ácido húmico e fúlvico), metabólito do glifosato (AMPA) e outros herbicidas e metabólitos da atrazina na determinação da concentração de glifosato 5,0 mg L⁻¹

Espécie	Concentração / mg L ⁻¹	Erro relativo / %
AMPA	15,0	6,0
	30,2	-3,3
Ácido fúlvico	5,0	13,2
	15,0	-6,0
Ácido húmico	5,0	-29,1
	15,0	-23,8
Diquat	15,0	47,0
Paraquat	15,0	2,0
Uréia	15,0	-0,1
hidroxiatrazina	15,0	7,3
desetilatrazina	15,0	115,9
desisopropilatrazina	15,0	114,8
atrazina	15,0	132,3
picloram	15,0	89,6

O efeito de alguns desses compostos foi reavaliado efetuando-se a etapa de pré-concentração no sentido de verificar se os efeitos de interferência seriam minimizados. Como o processo de retenção nas resinas se baseia na interação do glifosato carregado negativamente com os grupos amino protonados da resina, espécies carregadas positivamente, ou neutras, teriam sua interferência eliminada ou drasticamente diminuída. Os resultados desse novo estudo são mostrados na TABELA 4.4.

TABELA 4. 4: Efeito de alguns possíveis interferentes na determinação da concentração de uma solução de glifosato 4,0 mg L⁻¹ na presença de 10,0 mg L⁻¹ do interferente usando-se o procedimento de troca iônica na resina IRA-900 Cl

Espécies	Erro (%)
desisopropilatrizona	-8,8
Propazina	-8,1
Diquat	-25,7
Paraquat	-17,5
Atrazina	-7,8
Desetilatrizona	17,7
Ácido húmico	-33,3

A interferência de compostos eletroativos e neutros como atrazina, desisopropilatrizona e desetilatrizona diminuiu significativamente em relação aos estudos sem passagem da solução pela resina de troca iônica (TABELA 4.4), o que seria esperado, uma vez que esses compostos não deveriam ser retidos na fase estacionária. Por outro lado, herbicidas catiônicos como o diquat e paraquat apresentaram interferência negativa. Pode-se especular que tal fato ocorre por formação de par iônico

entre glifosato (ânion) e diquat ou paraquat (cátions), diminuindo a retenção na resina de troca iônica. Já a determinação na presença de ácido húmico continuou apresentando resultados negativos. Uma possível explicação para isso é a retenção do ácido húmico carregado negativamente nos grupos amino protonados da resina de troca iônica, competindo com o glifosato. O caso do ácido fúlvico, que não apresentou forte interferência na análise sem tratamento da amostra em coluna de troca iônica, foi ainda mais grave, pois não houve detecção de sinal voltamétrico do N-nitroso glifosato após o tratamento na resina. A explicação é provavelmente a mesma apresentada para o efeito do ácido húmico, sendo que o efeito mais pronunciado pode ser explicado pela maior concentração de sítios ionizáveis por unidade de massa no ácido fúlvico ($12 \pm 1 \text{ mmol g}^{-1}$, 91,3 % de contribuição de sítios carboxílicos) do que no ácido húmico ($5,2 \pm 0,5 \text{ mmol g}^{-1}$, 78,9% de contribuição de sítios carboxílicos), conforme demonstrado por Colombo e Masini (2007). Com isso, concluiu-se que os métodos aqui estudados não se mostraram adequados para análise de amostras de águas por dois motivos principais: (i) limites de detecção e quantificação elevados e (ii) baixa seletividade.

4.1.4 Determinação de glifosato em formulações comerciais

Três formulações comerciais foram analisadas, conforme descrito no item 3.2.3, pelo método de voltametria de onda quadrada em eletrodo de Hg, automatizado por injeção sequencial. Como a formulação de glifosato contém altas concentrações de surfactante, as amostras apresentam elevada viscosidade, uma propriedade que pode afetar os coeficientes de difusão do N-nitroso glifosato e, portanto, o transporte de massa para a superfície do eletrodo. Com isso uma curva de calibração externa, realizada em meio aquoso pode não ser confiável para quantificação devido ao chamado efeito de matriz. Uma maneira de se contornar esse efeito de matriz seria a realização de

elevadas diluições da amostra, ou pela utilização da técnica de adição de padrão. No presente trabalho foi verificado que a faixa de resposta linear do método vale para concentrações de glifosato entre 2,5 e 50 mg L⁻¹. Procurou-se diluir as amostras para essa faixa de concentrações e então avaliar a ocorrência de efeito de matriz por comparação dos coeficientes angulares obtidos em curvas analíticas de calibração externa e curvas de adição de padrão. A FIGURA 4.4 mostra os voltamogramas obtidos por adição de padrão a uma amostra de formulação comercial de glifosato diluída 32000 vezes em água destilada. A FIGURA 4.5 mostra a curva de adição de padrão construída a partir das medidas de corrente de pico sobreposta a uma curva analítica de calibração externa para as mesmas concentrações.

FIGURA 4. 4: Voltamogramas de onda quadrada do composto N-nitroso glifosato usados para construção de curva de adição de padrão visando a determinação da concentração do herbicida em uma formulação comercial, sendo que as concentrações de padrão adicionadas em cada caso foram: (a) 0, (b) 5,0, (c) 10,0 e (d) 15,0 mg L⁻¹. Condições experimentais: frequência de onda quadrada = 120 Hz, altura de pulso = 25 mV, volume de amostra = 500 µL, volume injetado = 400 µL.

FIGURA 4. 5: Curva de adição de padrão (■) sobreposta a curva analítica (●) para a quantificação de glifosato em formulação comercial. Condições experimentais: vide FIGURA 4.4.

As equações das curvas e seus coeficientes de correlação para os métodos de adição de padrão e da curva analítica são respectivamente iguais a $I_p = (-0,102 \pm 0,005)C_x + (-1,38 \pm 0,04)$, com $R = -0,9979$ e $I_p = (-0,099 \pm 0,002)C_x + (-0,13 \pm 0,03)$ com $R = -0,9994$. Uma vez que os coeficientes angulares são muito próximos, e não diferem estatisticamente entre si, pode-se concluir que devido à elevada diluição da amostra para se acomodar o sinal dentro da faixa de resposta linear conseguiu-se minimizar as possíveis interferências de matriz. Os resultados obtidos das análises de três amostras de formulações são apresentados na TABELA 4.5.

TABELA 4. 5: Resultados obtidos das análises de formulações comerciais de glifosato em comparação com o valor fornecido pelo fabricante

Amostra	Concentração indicada pelo fabricante (g L ⁻¹)	Concentração encontrada (g L ⁻¹)	Desvio ^b (%)
Roundup NA	360	351 ± 1	-2,6
Fersol 480 JA	360 ^a	357,0 ± 0,2	-0,8
X	360 ^a	261,5 ± 0,3	-28%

^a O valor fornecido no rótulo é de 480 g L⁻¹ do sal de isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina, que corresponde a 351 g L⁻¹ no ácido N-(fosfonometil) glicina (glifosato)

^b Considerado como a diferença entre o valor obtido e declarado.

Os resultados obtidos para as duas primeiras amostras são condizentes com o valor fornecido pelo fabricante, enquanto a terceira apresentou um resultado sistematicamente negativo. O método oficial para determinação de glifosato (Burns, 1983) foi revisado e atualizado por Gavlick and Tomkins (2008). Esses métodos se baseiam em cromatografia de troca iônica com detecção por absorção de radiação UV em 195 nm. Apesar do tratamento de amostra ser simples, bastando a diluição em água, as análises cromatográficas podem demorar de 8 a 15 min, dependendo do tipo de formulação (sal de K⁺, ou sal de isopropilamina de N-(fosfonometil)glicina), bem como de outros componentes da formulação que são retidos na fase estacionária e devem ser eluídos antes de uma nova análise. Assim, uma das contribuições do método proposto de voltametria de onda quadrada automatizada por injeção sequencial é o curto tempo de análise, salientando que apesar da etapa de derivatização demorar cerca de 15 min, a reação pode ser feita em um lote grande de amostras que seriam em seguida analisadas sequencialmente no sistema proposto, com um tempo de cerca de 48 s por análise. Outra vantagem é que o método proposto não usa solventes orgânicos como metanol,

usado na fase móvel do método oficial em concentrações de 10 a 15% (v v⁻¹). Por outro lado, o método proposto utiliza o eletrodo de gota de Hg, cujo gerenciamento dos resíduos pode ser complicado, requerendo etapas de lavagens e até mesmo destilação do metal para reutilização no capilar. Nesse sentido, futuros desenvolvimentos no presente método incluem investigações sobre o uso de eletrodos impressos e descartáveis de filme de Hg sobre carbono (Palchetti et al, 2005), ou principalmente, visando minimizar impactos ambientais, os eletrodos de filme de bismuto (Dominguez-Renedo et al, 2007).

4.2. DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE GLIFOSATO: APLICAÇÃO EM ESTUDOS DE ADSORÇÃO DE GLIFOSATO EM SOLO E SEDIMENTO

4.2.1. Determinação fluorimétrica de glifosato:

Métodos em fluxo possuem peculiaridades para serem avaliadas tais como vazão de envio ao detector, tempo de permanência em reatores, concentrações dos participantes nas reações, assim como volumes aspirados dos mesmos e suas características como a escolha de pH adequado. Esta parte do trabalho se dedica a demonstrar como estes parâmetros foram avaliados para o desenvolvimento do método. Pelo fato do glifosato não ser um composto fluorescente é necessário que o mesmo seja derivatizado e isto se consegue após a realização de duas etapas distintas. A primeira consiste na transformação do analito em glicina, como mostrado no esquema da reação 4.4:

Em seguida, por ser uma amina primária, a glicina obtida reage facilmente com *o*-ftaldialdeído em presença de 2-mercaptoetanol (OPA-MCE) para a formação de um composto altamente fluorescente – o **1-(2'-hidroxietiltio)-2-N-alquilisoindol** – conforme esquematizada na reação 4.5.

4.2.1.1. Conversão de glifosato à glicina

Neste trabalho, ambas as etapas de derivatização foram feitas de maneira automatizada (ítem 3.3), sendo que para a primeira reação utilizou-se uma bobina constituída por um tubo de politetrafluoroetileno de 0,8 mm de diâmetro com 80 cm de comprimento enrolada e colocada num tubo de vidro preenchido com água mantida sob aquecimento num bloco digestor (FIGURA 3.3). No intuito de obter homogeneização eficiente entre as soluções de glifosato e de ClO^- utilizou-se a estratégia de amostragem binária na formação de um monossegmento delimitado por bolhas de ar visando minimizar a dispersão da mistura reacional com a solução transportadora no trajeto ao detector (Reis et al, 1994; Vieira et al, 1998). As dimensões da bobina e os volumes de

solução foram planejados de modo que as duas bolhas de ar ficassem fora da parte aquecida do reator durante o período de parada de fluxo. A FIGURA 4.6 mostra a representação de como se deu a configuração da amostragem enviada ao reator aquecido. Após o tempo de parada, a bolha de ar mais próxima à válvula seletora foi descartada e 200 μL da zona de reação foram aspirados entre duas zonas de 100 μL de OPA-MCE e então injetados no detector (TABELA 3.1).

FIGURA 4. 6: Configuração da amostragem feita da mistura reacional que foi enviada ao reator aquecido no digestor

Uma primeira modificação na metodologia foi na temperatura do reator (FIGURA 3.3). A temperatura de conversão de glifosato em glicina tem sido relatada entre 38 e 60 °C. A temperatura de 48°C aumentou o sinal de fluorescência em comparação com a de 38 °C, sugerindo uma melhora na conversão de glifosato em glicina, de acordo com Abdullah et al (1995). A fragmentação das bolhas de ar do monossemento não foi observada em 48°C, o que seria provável de ocorrer em temperaturas mais altas.

Mantendo a temperatura em 48°C e a parada de fluxo de 60 s, a concentração de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ foi estudada na faixa de 15 a 60 mg L^{-1} , observando-se um aumento de sinal de cerca de 8% com o aumento de concentração até 30 mg L^{-1} para uma solução de glifosato 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Aumentando a concentração de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ até 60 mg L^{-1} observou-se diminuição de 29% do sinal de fluorescência, de modo que a concentração de 30 mg L^{-1} foi usada na sequência dos experimentos. Nessas condições a concentração de ClO^- no monossemento é 84 $\mu\text{mol L}^{-1}$, estando em grande excesso em relação a concentração de glifosato (4 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Essa concentração está de acordo com o relatado por Jiang and Lucy (2007), que encontraram um patamar de concentrações de OCl^- entre 67 e 270 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em experimentos feitos em batelada.

Outro parâmetro químico avaliado no desenvolvimento do método foi o pH da solução de hipoclorito (30 mg L^{-1}), efetuando variações de uma unidade na faixa de 2,0 a 11,0, ajustados com o sistema $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ e utilizando-se solução-padrão de glifosato com concentração 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, usando água desionizada como solução transportadora. O meio reacional foi formado conforme a FIGURA 4.6 e enviada para a bobina de reação aquecida a $(48,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, parando-se o fluxo por 90 s. Após o tempo de parada, a bolha de ar mais próxima à válvula seletora foi descartada e 200 μL da zona de reação foram aspirados entre duas zonas de 100 μL de OPA-MCE e

então injetados no detector (TABELA 3.1), obtendo-se os resultados mostrados na FIGURA 4.7.

Nota-se que na faixa dos pH's 5,0; 6,0 e 7,0 para a solução de hipoclorito em meio KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ os sinais analíticos obtidos foram os de maiores valores. No entanto, após o pH 7,0 o sinal analítico diminuiu bruscamente evidenciando assim uma região de trabalho inapropriada devido à suscetibilidade para a ocorrência da perda de sensibilidade, apesar de ser a de maior sinal obtido. Formação de cloroamina é uma possível reação colateral que leva à diminuição do sinal analítico. Tem sido relatado que ClO^- é mais reativo do que o ácido protonado (HClO), reagindo mais rapidamente com aminas protonadas. Considerando-se o pKa de HClO como 7,5 e o pKa da amina como 9,5, pode-se concluir que a formação de cloroamina seria favorecida em pH 8,5, explicando a queda de fluorescência observada em $\text{pH} > 7,0$ (Hawkins et al, 2003). Assim, optou-se por utilizar a solução do derivatizante hipoclorito de cálcio 30 mg L^{-1} em KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com pH previamente corrigido para 6,0 com uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, por se tratar de uma região que ofereceu uma estabilidade maior ao sinal analítico do que aquela observada em pH 5,0 e 7,0. Ainda visando manter uma estabilidade do pH, optou-se por usar uma solução transportadora composta por tampão fosfato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ ajustada a pH 6,0.

Adotando-se o pH 6,0, procurou-se avaliar a influência do tempo de parada de fluxo no reator aquecido na conversão de glifosato à glicina. Para isso, soluções de glifosato e de glicina de mesma concentração ($2,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) foram submetidas ao mesmo procedimento (TABELA 3.1), mas adotando paradas de fluxo de 15, 30, 60 e 90 s. A FIGURA 4.8 mostra a influência do tempo de permanência da mistura reacional na bobina aquecida na obtenção do sinal analítico para soluções de glifosato e glicina, ambas na concentração de $2,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

FIGURA 4. 7: Influência do pH da solução de hipoclorito de cálcio na obtenção do sinal analítico para uma solução de glifosato de concentração $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ tendo como transportador água desionizada após o envio da mistura reacional por 90 s a $(48,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

FIGURA 4. 8: Avaliação da influência do tempo de permanência da mistura reacional na bobina de aquecimento (48°C) para soluções de glifosato e glicina, separadamente, ambas na concentração de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A partir dos dados obtidos mostrados na FIGURA 4.8, calculou-se as taxas de conversão, mostradas na TABELA 4.6.

TABELA 4. 6: Avaliação dos tempos de permanência da mistura reacional na bobina aquecida a 48° C na taxa de conversão de glifosato em glicina

tempo (s)	Taxa de Conversão (%)
15	86,7
30	91,0
60	98,9
90	108,7

Pode-se notar que com o tempo de permanência de 60 s da mistura reacional no reator à temperatura de $(48,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ a taxa de conversão se deu praticamente em 100 %, mostrando ainda que em tempos inferiores a este, a eficiência deste processo diminuiu. No entanto, devido à elevada precisão característica dos sistemas em fluxo, os mesmos permitem a obtenção de sinais analíticos com elevada precisão sem a necessidade da ocorrência total da reação, como se pode verificar no tempo de 15 s, no qual a taxa de conversão é de 87%, mas com uma barra de erros que não é maior do que aquela observada, por exemplo, para parada de 60 s. Assim, uma parada de 15 s foi adotada em função da possibilidade de se ter maior frequência de amostragem sem perda significativa de precisão ou sensibilidade.

4.2.1.2. Conversão de glicina em 1-(2'-hidroxietiltio)-2-N-alquilisindol

A segunda etapa da análise é a reação entre a glicina formada na reação com hipoclorito e o reagente OPA-MCE (equação 4.4). Essa reação foi feita no modo não

segmentado, o que requereu a eliminação da bolha de ar mais próxima à válvula rotatória, bem como a porção de zona de reação que não estava na parte aquecida do reator (Etapa 9, TABELA 3.1). A zona de reação foi então formada intercalando 200 μL da zona de reação contendo a glicina entre duas zonas de 100 μL do reagente OPA-MCE. Estudos anteriores do grupo de pesquisa mostraram que esse perfil de zonas de amostra e de reagentes em tubo de diâmetro interno de 0,8 mm levam a um baixo coeficiente de dispersão (D) da zona de amostra ($1,5 < D < 2$), sem limitar o fornecimento de reagente às porções centrais da zona de amostra, desde que o reagente esteja presente em concentração suficientemente alta para atender à estequiometria da reação (Infante e Masini, 2007). A influência do tempo de residência na bobina de reação 2 (FIGURA 3.3) foi avaliada bombeando-se a zona de reação com diferentes vazões em direção ao detector e explorando uma etapa adicional de parada de fluxo. A solução de compromisso entre magnitude de sinal analítico e frequência de amostragem foi adotada para vazão de $40 \mu\text{L s}^{-1}$ sem parada de fluxo. Tempos de residência maiores na realidade levam a uma diminuição do sinal analítico devido à instabilidade do produto da reação entre glicina e OPA-MCE, em concordância com estudos de Hanczkó e Monar Perl (2003) que verificaram essa instabilidade para os aminoácidos contendo o grupo $-\text{CH}_2\text{NH}_2$.

4.2.2. Figuras de Mérito

A FIGURA 4.9 mostra os sinais analíticos em duplicata obtidos para o glifosato nas concentrações 0,25; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; e $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ após 15 s de permanência da mistura reacional com solução de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ em meio tamponado em pH 6,0 no reator mantido à temperatura de $(48,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. O sinal analítico correspondente ao pico máximo e a concentração de glifosato obedeceram a uma relação linear de acordo

com a equação $U.R.F. = (414 \pm 5)C + (83 \pm 12)$ com $R^2 = 0.999$, onde U.R.F. = Unidade Relativa de Fluorescência e C = concentração de glifosato. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram 0,08 e 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, calculados pelas equações: $LD = 3s / S$, e $LQ = 10s / S$, onde s é o desvio padrão da média de 10 medidas de branco e S é o coeficiente angular da curva analítica. Esses valores de LD e LQ correspondem a 14 e 42 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, sendo menores do que o nível de concentração máximo para água potável definido pela EPA de 700 $\mu\text{g L}^{-1}$, ou pelo CONAMA (65 $\mu\text{g L}^{-1}$). A repetibilidade das medidas foi avaliada em dois níveis de concentração, 0,25 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, apresentando valores de 5 e 2,5 %, respectivamente.

FIGURA 4. 9: Sinais transientes de fluorescência e curva analítica obtidos para soluções-padrões de glifosato nas concentrações de (a) 0; (b) 0,25; (c) 1,0; (d) 2,5; (e) 5,0; (f) 10,0; (g) 15,0 e (h) 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 15 s de permanência da mistura reacional à temperatura de $(48,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$

O método proposto consome 20 µg de OPA, 22 µg de MCE e 3 µg de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ por análise. O método 547 da EPA consome cerca de 650 µg de OPA, 360 µg de MCE e 98 µg de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ considerando a vazão dos reagentes como $0,50 \text{ mL min}^{-1}$ e o tempo de retenção de 13 min para o glifosato. A marcante economia de reagentes é uma característica vantajosa importante do método proposto, sendo uma característica geral dos sistemas de análise por injeção sequencial atendendo aos conceitos de química verde (Armenta et al, 2008).

4.2.3. Estudos de Adsorção e Dessorção

Adições de concentrações conhecidas glifosato no solo ou a extratos de sedimentos levaram a recuperações baixas como consequência de efeitos de matriz (diminuição da inclinação da curva de calibração) e sinal do branco elevado, o que pode ser atribuído a componentes da amostra que apresentam fluorescência sob as condições experimentais. Para contornar esses problemas, as curvas analíticas para os estudos de adsorção e dessorção foram obtidas na matriz da amostra, conforme descrito no item 3.3.4.2. Linearidade foi observada no intervalo de concentrações de glifosato entre 0,50 e 25 µmol L^{-1} , mas com uma inclinação que corresponde a aproximadamente 50% daquela obtida em água deionizada.

No solo, a porcentagem de adsorção diminuiu de 87% para uma concentração inicial de glifosato $5,0 \text{ µmol L}^{-1}$ ($0,84 \text{ mg L}^{-1}$) para 41% quando a concentração inicial aumentou para 320 µmol L^{-1} (54 mg L^{-1}). Os dados de adsorção foram bem representados por isothermas do tipo L (FIGURA 4.10), sendo ajustadas às equações de Langmuir e Freundlich ($R^2 > 0,97$). O parâmetro $1/n$ de $0,58 \pm 0,04$ (TABELA 4.7) sugere que a adsorção ocorre predominantemente em sítios específicos e heterogêneos. Como o solo tem um baixo teor de matéria orgânica, a adsorção é regulada por

interações com componentes minerais, principalmente argilominerais. Caulinita, com concentrações significativas de sesquióxidos (Fe_2O_3 e Al_2O_3), é o argilomineral dominante no solo estudado. Os valores de K_f obtidos estão coerentes com valores reportados para tipos similares de solo (Vereecken, 2005). Os parâmetros de Langmuir são menos comumente relatados na literatura, mas os resultados encontrados no presente trabalho são de magnitude semelhantes aos relatados por Piccolo et al (1994) para alguns solos europeus. Percentagens de dessorção variaram de 6 a 26% quando a concentração inicial adsorvida aumentou de 36 para cerca de 1100 mg kg^{-1} , indicando que, apesar de adsorção forte, lixiviação de glifosato para as camadas mais profundas do solo pode ocorrer.

FIGURA 4. 10: Isotermas de adsorção e dessorção ($25.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) para concentrações iniciais de glifosato entre $0,87$ e 54 mg L^{-1} (solo) e entre $0,87$ e 27 mg L^{-1} (sedimento) para uma massa de $200 \text{ mg} (\pm 0.1 \text{ mg})$ em presença de $10,0 \text{ mL}$ de solução. Os pontos no gráfico correspondem aos valores médios de duplicata de

experimentos. As linhas correspondem ao ajuste por regressão não linear à equação de Langmuir.

A adsorção na amostra de sedimento foi menos pronunciada do que no solo. As porcentagens de adsorção diminuíram de 60 a 17% com o aumento concentração de glifosato inicial de 5,0 a 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Experimentos de dessorção não apresentaram percentual de dessorção maior do que 26% da maior massa de glifosato adsorvida. As isotermas de adsorção e dessorção foram devidamente descritas pelas equações de Freundlich e Langmuir, com $R^2 > 0,98$ (FIGURA 4.10). Os parâmetros de adsorção (TABELA 4.7) obtidos para os sedimentos são consistentes com os valores descritos na literatura para solos arenosos (Vereecken, 2005).

TABELA 4. 7: Parâmetros de Freundlich and Langmuir para adsorção de glifosato

Amostra	Processo	Freundlich		Langmuir	
		$K_f (\text{mg}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{kg}^{-1})$	$1/n$	$a (\text{mg kg}^{-1})$	$b (\text{L kg}^{-1})$
solo	adsorção	170 ± 4	$0,58 \pm 0,04$	1384 ± 26	$0,12 \pm 0,01$
	dessorção	313 ± 17	$0,48 \pm 0,04$	941 ± 51	$0,58 \pm 0,09$
sedimento	adsorção	44 ± 7	$0,64 \pm 0,02$	295 ± 30	$0,20 \pm 0,05$
	dessorção	$100,4 \pm 0,1$	$0,62 \pm 0,1_1$	269 ± 10	$0,72 \pm 0,06$

Parâmetros de Freundlich e Langmuir confirmam que o solo estudado tem uma capacidade maior de adsorção de glifosato do que o sedimento e que ambos os adsorventes retêm fortemente o adsorbato. Essa retenção tem sido atribuída à interação entre o grupo fosfonato do glifosato e grupos hidroxila da superfície do óxido (Borggaard e Gimsing, 2008), como mostrado na FIGURA 1.4. A complexação entre o

glifosato e cátions metálicos liberados da argila e óxidos que constituem o solo e sedimentos, principalmente Fe (III), também tem sido sugerida como a reação de adsorção (Glass, 1987; Pessagno et al, 2008). Essas interações têm um papel importante na retenção de glifosato nas amostras de solo e sedimento estudados, uma vez que eles são ricos em óxidos de ferro. Tal como observado para o solo, a dessorção do sedimento não é desprezível, o que implica em potenciais de biodisponibilidade e mobilidade geoquímica do glifosato em ambientes aquáticos.

4.3. DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE GLIFOSATO E AMPA: APLICAÇÃO A AMOSTRAS DE ÁGUAS

4.3.1. Estudo de interferentes na determinação de glifosato

Avaliou-se também a possibilidade de outras espécies interferirem na determinação de glifosato. Desta forma, empregaram-se soluções do analito na concentração de $845 \mu\text{g L}^{-1}$ (uma concentração correspondente a $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença da substância que se desejou inferir do outro composto em concentrações variáveis. As substâncias estudadas incluíram outros herbicidas e metabólitos, tais como atrazina (AT), desetilatrazina (DEA), desisopropilatrazina (DIA); diquat; paraquat e propazina e AMPA.

Desta forma, utilizaram-se soluções de glifosato na ausência e na presença do composto cuja interferência iria ser avaliada, mediram-se os sinais de ambas em triplicatas e os mesmos foram comparados em termos das diferenças dos sinais obtidos em %, mostrados na TABELA 4.8.

TABELA 4. 8: Efeito de outros herbicidas e metabólitos da atrazina na determinação da concentração de glifosato 845 µg L⁻¹

Espécies (µg L ⁻¹)	Sinal	Diferença (%)	Espécies (µg L ⁻¹)	Sinal	Diferença (%)
	Analítico			Analítico	
AT (850)	2166	4,1	DIA (850)	2182	4,9
atrazina (850)	2229	7,1	diquat(850)	1785	-14,2
paraquat (850)	2391	14,9	propazina (850)	2306	10,8
AMPA (555)	448,6	19,1			

Considerando-se como interferentes as substâncias que causem variação de sinal analítico maior que 10% nota-se que, das substâncias analisadas, paraquat, propazina e diquat se classificam como interferentes, as quais, pelo menos nesta faixa de concentração, devem ser removidas previamente do meio no qual se deseja analisar o glifosato. Além destes, foram verificadas outras espécies com ênfase para componentes de solos e águas, tais como substâncias húmicas e espécies inorgânicas. A TABELA 4.9 mostra os resultados obtidos para espécies em diferentes concentrações na presença de soluções-padrões de glifosato 0,50 µmol L⁻¹.

TABELA 4. 9: Efeito de alguns constituintes da matéria orgânica natural de águas (ácido húmico e fúlvico), e outras espécies inorgânicas na determinação da concentração de glifosato 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$

Espécie ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Erro (%)	Espécie (mg L^{-1})	Erro (%)	Espécie (mg L^{-1})	Erro (%)
Fe (III) (0,25)	-21,4	AF (5,0)	+108,4	Cl ⁻ (250)	-36,6
Fe (III) (0,50)	-16,6	AF (10,0)	+166,1	N (0,1) de NO ₂ ⁻	-21,4
Mn (II) (0,50)	-5,8	AH (5,0)	-11,7	N (10) de NO ₃ ⁻	2,8
Ca ⁺² (0,50)	-2,9	AH (10,0)	-12,6	P (0,10) de PO ₄ ⁻³	2,4
Cu (II) (0,25)	-33,1	Al ⁺³ (0,1)	-9,3	S (250) de SO ₄ ⁻²	6,4
Cu (II) (0,50)	-46,4	Ca ⁺² (0,1)	-1,4		
Zn (0,50)	+2,5	Mg ⁺² (0,1)	-3,9		
HCO ₃ ⁻ (0,50)	-15,6				
Cl ⁻ (0,50)	-4,8				

Cátions metálicos como Fe (III) e Cu (II) causam interferência negativa severa, provavelmente como consequência da complexação pelo glifosato. Ácidos húmicos também interferem negativamente, mas quando ácido húmico e cátions metálicos são misturados, as interferências são < 5%. Este fato pode ser explicado pela complexação dos metais pelo ácido húmico, liberando glifosato para reações com hipoclorito e OPA-MCE. Por outro lado, ácido fúlvico apresentou interferência positiva forte, provavelmente por apresentar propriedades fluorescentes no conjunto de comprimentos de onda de excitação e emissão usados no método. Entre os ânions, cloreto é a interferência mais grave, diminuindo a fluorescência medida que aumenta a sua concentração. Nitrito também interfere negativamente, mas a sua presença em águas é menos abundante do que o cloreto.

4.3.2. Determinação de AMPA

A determinação de AMPA usa a mesma solução transportadora empregada na determinação de glifosato, e os mesmos reagentes, com exceção do hipoclorito de cálcio. O programa que controla o equipamento SIA é similar, mas sem as etapas de formação de monosegmento, ou seja, os volumes de amostra e de reagente são aspirados para a bobina coletora e em seguida injetados na bobina de reação 2 (ver FIGURA 3.3) em direção ao detector de fluorescência, programado com o mesmo conjunto de comprimentos de onda de excitação e emissão.

4.3.2.1. Avaliação da influência da temperatura na determinação de AMPA

A FIGURA 4.11 mostra a influência da temperatura no sinal analítico, sendo que foram aspiradas 4 zonas reacionais constituídas cada uma de volumes de 5 e 10 μL respectivamente de OPA/MCE e AMPA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e enviadas sob uma vazão de $200 \mu\text{L s}^{-1}$ por um tubo de Teflon® com 80 cm de comprimento o qual foi enrolado e imerso em água mantido num tubo de vidro colocado num compartimento de um bloco digestor.

Nota-se na FIGURA 4.11 a diminuição do sinal analítico que ocorreu de forma praticamente linear no intervalo 30 a 40 °C e que se tornou mais acentuada a partir da temperatura de $(50 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Com isso, demonstra-se que a temperatura ambiente é a melhor escolha para a determinação de AMPA.

FIGURA 4. 11: Avaliação da influência da temperatura na determinação de AMPA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.3.2.2. Avaliação da influência do número de etapas de amostragem contendo AMPA no sinal analítico

A FIGURA 4.12 mostra de maneira esquemática as fragmentações das zonas de amostra e reagente estudadas visando o aumento de sensibilidade na determinação de AMPA, baseando-se para isso no conceito de amostragem binária (Reis et al, 1994; Rocha et al, 2002) visando aumentar a eficiência da mistura entre as zonas reacionais.

FIGURA 4. 12: Configurações adotadas da mistura reacional enviada ao detector

A FIGURA 4.13 mostra a influência do número de ciclos de amostragem no sinal analítico, sendo que cada uma constituída por volumes de 5 e 10 μL de reagentes e amostra (AMPA 1,0 μmol L⁻¹), respectivamente, que foram aspirados sequencialmente nesta ordem.

FIGURA 4. 13: Influência do número de ciclos de amostragem no sinal analítico enviadas a uma vazão de $50 \mu\text{L s}^{-1}$ ao detector para uma solução de AMPA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Pode-se notar que o aumento do número de ciclos de amostragem ou do volume de amostra propiciou um incremento no sinal analítico o qual correspondia, de acordo com as condições analisadas, numa relação não-linear. Estequiometricamente, a relação das quantidades de 2-mercaptoetanol e OPA utilizadas foram respectivamente 30 e 20 vezes superiores a de AMPA. O resultado obtido está de acordo com o esperado em função do fato de quanto maior o volume de amostra menor é a dispersão no sistema (para um mesmo reator). Assim, a tendência assintótica observada no gráfico da FIGURA 4.13 é explicada por uma limitação da concentração de AMPA, ou seja, aproxima-se da condição de volume infinito de amostra em que o sinal obtido aproxima-se àquele que seria obtido em estado estacionário para uma mesma diluição

de amostra e contando que a reação seja instânea (sinal não influenciado pela cinética da reação).

Outro parâmetro investigado foi a fragmentação da zona de reação, mantendo os volumes totais de amostra e de reagente constantes. A TABELA 4.10 mostra os resultados obtidos para as diferentes formas empregadas no intuito de se aumentar a eficiência da homogeneização da mistura reacional a ser enviada ao detector.

TABELA 4. 10: Resultados obtidos para as diferentes fragmentações dos volumes totais das soluções de OPA/mercaptoetanol (50 μL) e AMPA 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (100 μL)

N x (R:A) ^{a,b}	Média do sinal analítico	desvio-padrão
2 x (25:50)	486	4
5 x (10:20)	659	1
10 x (5:10)	677	0,3

^a R = volume de reagente, A = volume de amostra

^b Em todos os casos volume de reagente = 50 μL e volume de amostra = 100 μL

A configuração que gerou um maior sinal analítico foi a “10 x (5:10)” isto é aquela na qual foram aspirados alternadamente 10 porções de 5 μL de OPA-MCE e 10 μL de AMPA 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. No entanto, optou-se pela segunda configuração, 5x(10:20), pois esta representou um aumento de 36% no sinal analítico em relação à primeira, 2 x (25:50), e apenas 3,6% menor que a terceira configuração, 10x(5:10) . Tal escolha se deu pelo fato de se aumentar a frequência de amostragem, pois um menor número de etapas adotadas acarreta numa demanda menor de tempo para que as execuções destas sejam feitas.

4.3.2.3 Avaliação da influência da vazão de envio da mistura reacional ao detector

A FIGURA 4.14 mostra os resultados obtidos no estudo da influência das vazões de envio da mistura reacional contendo OPA-MCE e AMPA $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ao detector.

FIGURA 4. 14: Avaliação da influência da vazão de envio da mistura reacional contendo AMPA e OPA-MCE ao detector na obtenção do sinal analítico.

Pode-se observar uma tendência à formação de um patamar no intervalo de vazões de 80 a $150 \mu\text{L s}^{-1}$ mostrando que a máxima eficiência na obtenção do sinal foi atingida nesta configuração. Ao se aumentar a vazão de envio da mistura, nota-se uma diminuição no desvio-padrão dos dados obtidos. Já, para as vazões maiores do que $150 \mu\text{L s}^{-1}$ houve uma diminuição nos sinais analíticos, indicando que a reação procedeu em menor extensão devido ao curto tempo de residência.

A TABELA 4.11 apresenta um resumo comparativo entre as características dos métodos para determinação de glifosato e AMPA. Observam-se para ambos os analitos as mesmas faixas de resposta linear e limites de detecção e quantificação muito

próximos. No entanto, as frequências de amostragem são visivelmente distintas pelo fato da análise de glifosato requerer uma etapa de derivatização a mais, a qual corresponde em sua conversão para glicina, e desta forma, o volume de resíduo para a determinação deste analito foi maior.

TABELA 4. 11: Parâmetros analíticos obtidos das curvas analíticas de glifosato e AMPA

Parâmetros Analíticos	Glifosato	AMPA
Frequência de amostragem (h ⁻¹)	18	36
Limite de detecção (μmol L ⁻¹)	0,02	0,07
Limite de quantificação (μmol L ⁻¹)	0,06	0,24
Faixa de resposta linear (μmol L ⁻¹)	0,25 – 25,0	0,25 – 25,0
Volume de amostra (μL)	400	200
Volume de resíduo (mL)	5,0	1,5

4.3.3. Análise em amostras de águas

A exatidão dos métodos para determinação de AMPA e glifosato foi avaliada por testes de adição e recuperação, enriquecendo cinco amostras de águas com três níveis de concentração (0,25, 2,5 e 5,0 μmol L⁻¹). Os resultados de porcentagem de recuperação são mostrados na TABELA 4.12. No nível de concentração mais baixo para glifosato (42 μg L⁻¹), recuperações de 83 (Poço artesiano Osasco) a 126% (água de torneira) foram encontrados. Para a amostra do poço artesiano do município de Osasco, as recuperações foram baixas também nos níveis de concentração mais altos, indicando a presença de interferentes que causam erros negativos, tais como Cl⁻, cátions metálicos de Fe(III) ou Cu(II), ou ainda ácidos húmicos (TABELA 4.9) Os resultados indicam uma exatidão razoável para o método, especialmente pelo fato de que as amostras não foram submetidas a tratamentos de pré-concentração e mudança de matriz, como

descrito por Molina e Silva (2001), Jiang e Lucy (2007), Corbera et al (2006) e Hanke et al (2008), indicando que o método teria aplicabilidade em trabalhos de triagem de amostra.

Apesar do limite de quantificação de AMPA ter sido determinado como 0,24 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (TABELA 4.11), nas amostras reais, o nível de concentração de 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ não foi detectado nas amostras (TABELA 4.12), indicando a presença de interferentes com forte atenuação da fluorescência do composto formado entre AMPA e OPA-MCE. Para os demais níveis de concentração as taxas de recuperação variaram entre 66% (Parque do Jaraguá) a 133 % (água de torneira), indicando que o método, assim como para glifosato, tem aplicabilidade em trabalhos de triagem de amostras.

TABELA 4. 12: Resultados obtidos para estudos de adição e recuperação em amostras de água para glifosato e AMPA em 3 níveis de concentração

Amostras	Concentrações ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)	
		Glifosato	AMPA
Nascente do Pq. do Jaraguá	0,25	104,4	-
	2,5	103,7	65,8
	5,0	107,1	96,7
Nascente do Pq. dos Remédios	0,25	85,2	-
	2,5	87,9	88,5
	5,0	94,2	108,1
Poço artesiano em Osasco	0,25	83,3	-
	2,5	57,0	73,7
	5,0	67,0	85,9
Água de Torneira 1	0,25	126,2	-
	2,5	103,3	119,4
	5,0	107,0	133,0
Água de Torneira 2	0,25	110,9	-
	2,5	103,6	89,9
	5,0	96,8	98,1

4.4. DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO POR INJEÇÃO SEQUENCIAL

As condições experimentais para a reação de conversão de glifosato em glicina, assim como as condições de reação entre a glicina e OPA-MCE foram baseadas nos trabalhos anteriores desta tese (Colombo e Masini, 2011). Inicialmente procurou-se avaliar a interferência de glicina no sinal de AMPA e vice versa, bem como a taxa de conversão de glifosato em glicina no sistema proposto. Para isso foi usada uma fase móvel constituída por mistura 20:80 (v v⁻¹) metanol: tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ em pH 7,2, condição essa previamente estabelecida em outros estudos do grupo para separação de aminoácidos (Rigobello-Masini et al, 2008; Penteado et al, 2009). O cromatograma de uma solução de AMPA 5,0 µmol L⁻¹ sobreposto ao de uma solução 5,0 µmol L⁻¹ de glicina e ao de uma mistura de AMPA e glifosato, ambos na concentração de 5,0 µmol L⁻¹ é mostrado na FIGURA 4.15. A separação entre AMPA e glicina é possível com resolução de 1,8. As áreas e alturas de pico de AMPA não foram afetadas pela presença de glifosato ou de glicina (variação de ±3%) correspondendo a variações aleatórias que podem ser atribuídas a erros indeterminados de análise e preparo de soluções. Na realização desses experimentos notou-se que a solução de glifosato apresentava um pico no tempo de retenção da glicina, que pode ser decorrência de resíduo da zona de reação formada entre glifosato e hipoclorito na bobina coletora que não foi quantitativamente enviada para bobina de reação aquecida (FIGURA 3.4). Quando se usa monosegmento essa transferência é possível, mas como a solução transportadora contém agora metanol, as bolhas não se mostraram estáveis no transporte de uma bobina para outra, de modo que a estratégia usada no estudo anterior (Ítem 4.2) não foi adotada no presente caso. Mesmo assim, pode-se estimar que a taxa de conversão de glifosato em glicina foi de 85 ± 5%.

FIGURA 4. 15: Cromatogramas de AMPA (1), glicina (2) e mistura de glifosato (3) e AMPA em concentração $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A primeira parte do cromatograma é realizada após reação direta da amostra com o reagente OPA-MCE, permitindo identificar os picos de AMPA e glicina. A segunda parte ($t > 400 \text{ s}$) representa a análise da solução submetida à reação com hipoclorito antes da reação com OPA-MCE, permitindo identificar o pico de AMPA e de glicina (produto da reação de glifosato com hipoclorito - pico 3). Condições da análise: volume de amostra nas etapas 1 e 2: 60 e 80 μL , respectivamente. Vazão durante as etapas de eluição: 20 $\mu\text{L s}^{-1}$. Fase móvel: metanol:tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 7,2) na proporção 20:80 (v v⁻¹). Detector: $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 450 \text{ nm}$

Na segunda etapa da análise, correspondente à determinação de glifosato, observa-se que o pico referente ao AMPA (FIGURA 4.15) é drasticamente diminuído, o que pode ser atribuído à diluição da zona de amostra no monosegmento, mas mais

provavelmente a algum efeito de degradação química nas condições de reação em presença de hipoclorito. Essa drástica diminuição do pico de AMPA foi o motivo de se realizar a análise em duas etapas, procurando ter um método de alta sensibilidade para AMPA e não apenas para glifosato. O problema da perda de sinal para AMPA é muito mais pronunciado para baixas concentrações, como será visto mais adiante.

A FIGURA 4.16 mostra uma triplicata de cromatogramas de uma mistura de AMPA e glifosato na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, de onde se pode calcular os desvios padrões relativos de áreas para AMPA e glifosato, que foram de 3,9 e 3,3%, respectivamente. Quanto aos tempos de retenção, os desvios padrões relativos foram de 0,4 e 1,4% para AMPA e glifosato, respectivamente.

Um problema que foi verificado nas etapas anteriores desse trabalho foi a interferência causada por matéria orgânica natural, especialmente ácido fúlvico, que apresenta propriedades fluorescentes (Richard et al, 2011). Dada a alta polaridade do ácido fúlvico em pHs próximos ao da neutralidade, condição na qual os grupos carboxílicos encontram-se desprotonados (Colombo e Masini, 2007), sua interação com a fase estacionária apolar (C_{18}) deve ser muito fraca e, com isso seu tempo de retenção muito baixo. Injetando-se uma mistura de AMPA e glifosato $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de 10 mg L^{-1} de ácido fúlvico obteve-se um cromatograma (FIGURA 4.17) que mostra dois picos não observados na ausência do ácido fúlvico, o maior deles com tempo de retenção menor do que AMPA e outro maior. Algum grau de interferência ainda foi observado, pois as áreas do pico de AMPA na presença do ácido fúlvico apresentaram um aumento de cerca de 7% em relação ao pico na ausência do ácido fúlvico. Entretanto deve-se salientar que esse nível de interferência é muito menor do que aquele observado quando não se usou a técnica cromatográfica de análise.

FIGURA 4. 16: Triplicata de cromatogramas de uma mistura de AMPA (1) e glifosato (3) $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de impurezas de glicina (2) nas condições cromatográficas: volume de amostra nas etapas 1 e 2: 60 e 80 μL , respectivamente. Vazão durante as etapas de eluição: $20 \mu\text{L s}^{-1}$. Fase móvel: metanol:tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 7,2) na proporção 20:80 (v v⁻¹). Detector: $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 450 \text{ nm}$

FIGURA 4. 17: Cromatogramas de uma mistura de AMPA (1) e glifosato (2) $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em comparação com o cromatograma de uma mistura dos mesmos compostos nas mesmas concentrações, mas na presença de 10 mg L^{-1} de ácido fúlvico (3) nas condições cromatográficas: volume de amostra nas etapas 1 e 2: 60 e 80 μL , respectivamente. Vazão durante as etapas de eluição: $20 \mu\text{L s}^{-1}$. Fase móvel: metanol:tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 7,2) na proporção 20:80 (v v⁻¹). Detector: $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 450 \text{ nm}$

Efetuuou-se a construção de uma curva analítica para concentrações entre $0,050$ e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, verificando-se que a altura de pico de glifosato e AMPA obedeceram uma relação linear com a concentração até $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 4.18). Para a solução $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ nota-se que para AMPA o sinal aumenta de maneira não linear, enquanto para glifosato o sinal apresenta um comportamento assintótico, ou seja, a variação de sinal diminui com o aumento da concentração, o que foi verificado injetando com concentrações de até $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos dois compostos. Por outro lado, a partir da concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ o sinal para AMPA passou a aparecer intensamente

mesmo no segundo ciclo da análise. Pode-se inferir que nas condições estudadas pode haver uma limitação de reagente OPA-MCE, que para concentrações mais altas reage preferencialmente com AMPA em vez de glicina.

FIGURA 4. 18: Cromatogramas para construção de uma curva analítica para AMPA (1) e glifosato (2) nas concentrações (a) 0,50; (b) 1,0; (c) 2,5; (d) 5,0 e (e) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A inserção mostra as curvas analíticas com resposta linear na faixa de concentrações de 0,50 a 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições cromatográficas: volume de amostra nas etapas 1 e 2: 60 e 80 μL , respectivamente. Vazão durante as etapas de eluição: 20 $\mu\text{L s}^{-1}$. Fase móvel: metanol:tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 7,2) na proporção 20:80 (v v⁻¹). Detector: $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 450 \text{ nm}$

Alguns experimentos realizados com altas concentrações de AMPA e glifosato (2,5 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) mostram um elevado sinal de AMPA e ótima linearidade de resposta na primeira parte do cromatograma. Na segunda parte observou-se uma

resposta linear para AMPA entre concentrações 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em detrimento da resposta de glifosato.

Em decorrência da estreita faixa de linearidade de resposta do glifosato, que se confirmou em outros experimentos, fez-se uma alteração no pH da fase móvel, reduzindo-o de 7,2 para 6,8, visando manter uma consistência com os estudos anteriores (FIGURA 4.7), que mostraram que as maiores taxas de conversão de glifosato em glicina foram obtidas numa faixa de pH entre 5 e 7, com uma queda abrupta de sinal para $\text{pH} > 7$. Fez-se também uma alteração da composição de fase móvel, aumentando a concentração de modificador orgânico de 20 para 25% (v v⁻¹) de metanol, visando diminuir os tempos de retenção sem prejudicar a resolução entre glicina e AMPA, mas podendo ter maior flexibilidade para lavagem da coluna no final dos experimentos, uma vez que a capacidade volumétrica da bomba é de 4,0 mL.

Nessas novas condições foram obtidos cromatogramas de soluções de glifosato e AMPA 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ isoladas (FIGURA 4.19), nos quais não se observa interferência mútua do sinal de uma substância na outra. Novamente, nessas condições, o pico de AMPA é quase imperceptível na segunda parte da análise. Nessas condições foi construída uma curva analítica com concentrações de AMPA e glifosato variando entre 0,50 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 4.20). Os parâmetros da curva analítica, como coeficientes angular e linear e coeficiente de correlação são mostrados na TABELA 4.13, juntamente com os tempos de retenção, limites de detecção e de quantificação.

FIGURA 4. 19: Cromatogramas de soluções de AMPA e glifosato $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ nas condições cromatográficas: volume de amostra nas etapas 1 e 2: 60 e 80 μL , respectivamente. Vazão durante as etapas de eluição: $25 \mu\text{L s}^{-1}$. Fase móvel: metanol:tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,8) na proporção 25:75 (v v⁻¹). Detector: $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 450 \text{ nm}$

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados usando o desvio padrão das áreas de pico obtidas de sete cromatogramas de uma solução de AMPA e glifosato $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$, bem como do coeficiente angular da curva analítica, calculado a partir do gráfico de áreas de pico em função da concentração dos analitos (INMETRO, 2003).

O limite de detecção foi calculado usando a relação $LD = 3s / m$, e o limite de quantificação, como $LD = 10s / m$, onde s é o desvio padrão da área dos picos da solução $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e m é o coeficiente angular da reta. A diferenciação do

cromatograma de uma solução $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$, concentração próxima ao limite de quantificação, do cromatograma de um branco analítico, é ilustrada na FIGURA 4.2.1.

FIGURA 4. 20: Cromatogramas para construção de uma curva analítica para AMPA e glifosato nas concentrações (a) branco; (b) $0,50$; (c) $1,0$; (d) $2,5$; (e) $5,0$ e (f) $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A inserção mostra as curvas analíticas com resposta linear na faixa de concentrações de $0,50$ a $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições cromatográficas: volume de amostra nas etapas 1 e 2: 60 e $80 \mu\text{L}$, respectivamente. Vazão durante as etapas de eluição: $25 \mu\text{L s}^{-1}$. Fase móvel: metanol:tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH $6,8$) na proporção $25:75$ (v v $^{-1}$). Detector: $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 450 \text{ nm}$

TABELA 4. 13: Tempos de retenção, parâmetros da curva analítica para uma faixa de concentrações de AMPA e glifosato entre 0,50 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (85 a 1690 $\mu\text{g L}^{-1}$) e os limites de detecção e quantificação do método

Composto	$t_R(\text{s})^a$	Coef. Angular/ 10^3 ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$)	Coef. linear / 10^2	R^2	LD^b ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ^c ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
AMPA	202 ± 2	$0,98 \pm 0,03$	$0,4 \pm 2$	0,994	0,14	0,42
Glifosato	463 ± 1	$1,60 \pm 0,05$	-3 ± 3	0,994	0,11	0,33

^a média e estimativa de desvio padrão de 10 medidas

^b 16 e 19 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AMPA e glifosato, respectivamente

^c 47 e 56 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AMPA e glifosato, respectivamente

FIGURA 4. 21: Duplicata de cromatogramas de uma mistura de AMPA e glifosato na concentração 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobrepostos ao branco de análise, os quais foram usados para estimar os limites de detecção e quantificação instrumental a partir da relação sinal/ruído. Condições cromatográficas: volume de amostra nas etapas 1 e 2: 60 e 80 μL , respectivamente. Vazão durante as etapas de eluição: 25 $\mu\text{L s}^{-1}$. Fase móvel: metanol:tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,8) na proporção 25:75 (v v⁻¹). Detector: $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 450 \text{ nm}$

Os limites de detecção e de quantificação obtidos para glifosato atendem aos limites preconizados pela legislação do CONAMA e da EPA, que permitem concentrações de 65 e 700 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, para atender ao limite da Comunidade Europeia (0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$), ainda é necessária a implantação de extensiva etapa de pré-concentração, como descrito por vários autores (Patsias et al, 2001, Jiang e Lucy, 2007, Hanke et al, 2008). Em termos comparativos, o método cromatográfico recomendado pela EPA (1990) apresenta um limite de detecção de 6 a 9 $\mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, um valor pelo menos duas vezes menor do que o encontrado pelo método proposto, enfatizando a necessidade de pré-concentração na análise de amostras mais diluídas.

A frequência de amostragem do método é de 6,5 análises por hora, enquanto no método cromatográfico recomendado pela EPA (1990) o glifosato é eluído em cerca de 13 min, com etapa de limpeza da coluna até cerca de 20 min, implicando em uma frequência de amostragem de 3 análises por hora. Assim, o método proposto por SIC tem uma frequência de amostragem que é o dobro daquela do método oficial.

O consumo de reagentes por análise pode ser descrito como: 3 μg de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, 20 μg de OPA, 2,3 μg de 2-mercaptoetanol, 1,9 mL de metanol e 0,10 g de KH_2PO_4 , gerando um volume total de 7,6 mL de resíduos. Esse consumo é da mesma ordem de grandeza daquele descrito no método de análise por injeção sequencial sem separação cromatográfica (Colombo e Masini, 2011), com exceção do metanol, que não era consumido naquele caso. O consumo de reagentes propiciado pelo método SIC se restringe a uma pequena fração do que é consumido no método da EPA (1990), o que pode ser explicado pela característica intermitente do fluxo. Nesse caso os volumes de reagentes por análise são pré-definidos e usados apenas em quantidades suficientes para sofrer interdispersão com a zona de amostra, ou seja, os reagentes não são continuamente bombeados como ocorre em cromatografia a líquido convencional. Com

isso, o método aqui proposto atende aos princípios da química verde, uma característica dos sistemas de análise por injeção sequencial (Rocha et al, 2001; Armenta et al, 2008).

O método foi aplicado a três amostras de águas subterrâneas coletadas em poço artesiano do município de Osasco e nos Parques do Jaraguá e dos Remédios na Região Metropolitana de São Paulo. Não foram encontradas concentrações detectáveis de glifosato ou AMPA nessas amostras. Para verificar a aplicabilidade do método a essas amostras procedeu-se o enriquecimento das mesmas com níveis de concentração de 0,50 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glifosato e AMPA. As amostras foram injetadas diretamente no sistema, sem tratamento prévio além da filtração em membrana de 0,45 μm . Os resultados de taxas de recuperação variaram entre 74 e 140%, sendo que os melhores resultados foram obtidos para recuperação de glifosato no nível de concentração de 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (84 a 96%), justamente o nível mais próximo do limite de quantificação. Para glifosato no nível de concentração de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ as taxas de recuperação variaram entre 74 e 88 %. No caso de AMPA, as taxas de recuperação variaram entre 82 e 140 % no nível de concentração de 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo que o resultado de 140% foi obtido para a amostra de poço artesiano do município de Osasco, não sendo clara a razão para a obtenção de um valor tão elevado. Para o nível de concentração de 5,0 $\mu\text{mol L}$ as taxas de recuperação variaram de 104% (poço artesiano) a 128% (Parque do Jaraguá). Assim, para a maior parte das amostras e níveis de concentração, as taxas de recuperação ficaram no intervalo de 70 a 120% que são considerados aceitáveis, desde que com precisão de até $\pm 20\%$ (Ribani, 2004; GARP, 2009). A partir das estimativas de desvio padrão dados na TABELA 4.14 verifica-se que os desvios padrões relativos das determinações variaram entre 1,4% (AMPA, poço artesiano, nível 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a 23% (glifosato, Poço artesiano, nível 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

TABELA 4. 14: Resultados dos testes de adição e recuperação realizados em duplicata em três amostras de água enriquecidas com 0,50 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$

Amostra	AMPA 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$		AMPA 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$		Glifosato 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$		Glifosato 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	
	Encontrado	Recuperação	Encontrado	Recuperação	Encontrado	Recuperação	Encontrado	Recuperação
	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(%)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(%)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(%)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(%)
Poço Artesiano ^a	0,70 $\pm$ 0,01	140	5,2 $\pm$ 0,9	104	0,4 ₂ $\pm$ 0,1 ₀	84	4,4 $\pm$ 0,1	88
Pq. do Jaraguá ^b	0,42 $\pm$ 0,04	84	6,4 $\pm$ 0,3	128	0,46 $\pm$ 0,03	92	3,89 $\pm$ 0,08	78
Pq. dos Remédios ^b	0,41 $\pm$ 0,02	82	5,9 $\pm$ 0,5	118	0,48 $\pm$ 0,01	96	3,7 $\pm$ 0,3	74

^a Água de poço artesiano coletada no município Osasco, SP

^b Águas de Fontes

O método aqui apresentado tem aplicabilidade para triagem de amostras, e ainda não se encontra totalmente desenvolvido, sendo que estudos sobre composição de fase móvel e relações de volumes e reagentes ainda precisam ser melhor avaliados visando um aumento de seletividade e sensibilidade. A exatidão precisa ainda ser melhorada, o que passa também por ajustes da composição de fase móvel. É necessário ainda realizar um estudo mais completo de validação, procurando-se avaliar a seletividade e eventualmente implantar etapas de tratamento de amostra por extração em fase sólida com resinas de troca iônica, processos que são comumente empregados quando se busca o desenvolvimento de métodos de alta sensibilidade visando atingir o limite de concentração de glifosato permitido pela Comunidade Europeia ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$).

4.5. ESTUDO DO EFEITO DE GLIFOSATO EM CULTIVOS DE MICROALGAS

Nas concentrações de 2 e 50 mg L^{-1} o glifosato não provocou mudança significativa no crescimento em ambas as algas quando comparado com o cultivo controle (B). A alga *T. gracilis* apresentou leve estímulo do crescimento na concentração de 1 mg L^{-1} de glifosato. Na concentração de 200 mg L^{-1} de glifosato houve inibição acentuada no crescimento de ambas as algas. A concentração mais alta de glifosato empregada, 1000 mg L^{-1} , provocou rompimento celular e morte acentuados já no primeiro dia após a aplicação do herbicida no meio de cultivo de ambas as algas (FIGURAS 4.22a e 4.22b).

FIGURA 4. 22: Curvas de crescimento celular de (a) *T. gracilis* e (b) *P. tricornutum* na presença de diferentes concentrações de glifosato: 0 (B), 2, 50,

As concentrações de glifosato de 1 e 50 mg L⁻¹ provocaram poucas alterações no pH dos meios de cultivo durante o experimento quando comparados com o cultivo controle, que variavam entre 8,9 e 10,5 para ambas as algas. Quando a concentração empregada era de 200 mg/L o pH variou em mais de 1,5 unidade em relação ao cultivo controle. Uma grande queda de pH, que depois variou entre 2,5 e 3,8 para ambas as algas durante o restante do experimento, ocorreu quando a concentração de glifosato adicionada aos cultivos foi de 1000 mg L⁻¹ (FIGURA 4.23a e b).

O glifosato é uma molécula zwitterionica, o que faz com que sua difusão através de membranas celulares lipoproteicas seja dificultada, explicando, em parte, sua baixa toxicidade em meio aquático (Schonherr, 2002). As concentrações mais altas de glifosato adicionadas aos cultivos provocaram mudanças no pH do meio que poderiam, tanto favorecer o transporte do glifosato através das membranas, aumentando sua toxicidade por favorecer sua disponibilidade no sítio bioquímico de atuação, quanto propiciar uma condição em que membranas celulares se rompiam, causando morte celular. O estímulo ao crescimento provocado pelo glifosato pode ser devido ao fosfato que é liberado na degradação da molécula do herbicida (Huang et al, 2005, Karpouzas e Singh, 2006), dado que o glifosato foi adicionado aos cultivos numa fase em que a concentração de fosfato no meio dos cultivos já poderia estar limitando o crescimento das algas (Masini et al, 2001, Ternan et al, 1998), embora outros fatores que ainda devem ser elucidados podem ser a causa desse estímulo.

FIGURA 4. 23 Variação do pH ao longo dos dias de cultivo de (a) *T. gracilis* e (b) *P. tricornutum* em diferentes concentrações de glifosato: 0 (B), 2, 50, 200 e 1000 mg L⁻¹

O glifosato estimulou a fluorescência máxima (Fm) e basal (F) em algumas concentrações empregadas no cultivo (FIGURA 4.24, I e II, a, b e c). Apesar da alga *T. gracilis* ter Fm e F aumentadas na concentração de glifosato de 1 mg L⁻¹, e *P. tricornutum* ter F aumentada na concentração de glifosato de 100 mg L⁻¹, o valor do rendimento quântico da fotossíntese (Y), foi menor que o valor obtido nos cultivos controle, em *T. gracilis*, durante todos os cinco dias do experimento nessas concentrações de glifosato; nos cultivos de *P. tricornutum*, o valor de Y, nos cultivos aos quais glifosato 2, 50 e 200 mg L⁻¹ foi adicionado, tornou-se mais alto do que o valor de Y dos cultivos controle apenas após o terceiro dia do experimento. Os aumentos em F e Fm não acompanhados por aumento em Y indicam que, na condição ambiental em que foi feita a medida, o processo fotossintético algal teve uma diminuição no seu rendimento. Essa diminuição pode ter sido provocada por retroalimentação negativa das reações da fase escura do processo, quando um provável excesso de ácido shiquímico, causado pela ação do glifosato na enzima FPSS, inibiu a síntese de redutores produzidos na etapa clara da fotossíntese, aumentando assim a dissipação de energia na forma de calor, para que redutores em excesso não causassem dano ao aparato fotossintético.

Os níveis intracelulares de aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano (FIGURA 4.25) variaram de forma diversa nas duas algas estudadas. No dia inicial do experimento as concentrações intracelulares de aminoácidos estavam mais altas do que nos demais pontos das curvas avaliados. As concentrações do triptofano foram mais altas que as concentrações do controle durante todos os dias avaliados, quando o glifosato foi adicionado na concentração de 200 mg L⁻¹ na alga *P. tricornutum*. Na *T. gracilis* esse aumento passou a ocorrer apenas dois dias após a adição de glifosato também na concentração de 200 mg L⁻¹.

FIGURA 4. 24: Curvas de fluorescência (a), fluorescência máxima (b) e rendimento quântico (c) para as microalgas *T. gracilis* (I) e *P. tricornutum* (II) em direntes concentrações de glifosato: 0 (B), 2, 50, 200 e 1000 mg L⁻¹.

A concentração intracelular da fenilalanina foi mais baixa nos cultivos de *P. tricornutum* aos quais foi adicionado glifosato, do que nos cultivos controle, em quase todos os pontos medidos. Nos cultivos de *T. gracilis* houve aumento da concentração de fenilalanina a partir do segundo dia após a adição de glifosato na concentração de 200 mg L⁻¹. A concentração de tirosina na *P. tricornutum* variou de forma semelhante àquela ocorrida para a fenilalanina, não apresentando aumento em relação ao controle. Nos cultivos de *T. gracilis* o aumento da concentração de tirosina em relação ao controle foi expressivo em todos os dias após a adição de glifosato 200 mg L⁻¹. As diferenças de perfis de aminoácidos obtidas para as duas algas podem ser devidas às diferenças nas barreiras à entrada do glifosato que existem entre as algas verdes e as diatomáceas, as quais apresentam parede de sílica. A alga *P. tricornutum* apresenta vacúolos que permitem armazenamento de nitrogênio e fosfato. Esse fator pode influenciar as relações entre os níveis dos aminoácidos nessas algas, quando sob efeito do glifosato.

A glicina intracelular decresceu em todas as concentrações de glifosato estudadas e também no controle durante o experimento (FIGURA 4.25). Quando determinada extracelularmente apresenta-se em concentrações que aumentam após o início do experimento. Pode ser proveniente de degradação do glifosato ou de impurezas presentes no glifosato adicionado (resultados mostrados apenas para *T. gracilis*).

Mais informações devem ser obtidas para que sejam elucidadas as interações metabólicas causadas pela presença do glifosato, tais como o efeito do glifosato na atividade de enzimas que influenciam a assimilação de carbono e de nitrogênio.

FIGURA 4. 25: Variação das concentrações de aminoácidos aromáticos Tyr (a), Trp (b) e Phe (c) nas microalgas *T. gracilis* (I) e *P. tricornutum* (II) (b) em função das concentrações de glifosato: 0 (B), 2, 50 e 200 mg L^{-1}

FIGURA 4. 26: Concentrações de glicina intracelular (a) e no meio de cultivos (b e c) em função do dia de cultivo e da concentração de glifosato adicionada: 0 (B), 2, 50, 200 e 1000 mg L^{-1}

5.0 CONCLUSÕES

A técnica voltamétrica possibilitou a determinação de glifosato em formulações comerciais após simples diluição da amostra, sendo que o acoplamento da mesma com o SIA causou uma baixa geração de resíduos.

As características propiciadas pela análise por injeção sequencial foram exploradas para desenvolver um método para a determinação de glifosato baseado em duas etapas: (i) transformação de glifosato em glicina por hipoclorito e (ii) formação do isoindol fluorescente a partir da reação entre glicina e *o*-ftaldialdeído e 2-mercaptoetanol. Em comparação com métodos cromatográficos de análise baseados nas mesmas reações químicas, o método aqui proposto é mais rápido, permite uma amostragem de 18 amostras h⁻¹ consumindo apenas uma fração de reagentes, mas é suscetível a vários interferentes. Foi aplicado para estudar os fenômenos de adsorção e dessorção do glifosato no solo e em amostra de sedimento produzindo parâmetros de Freundlich e Langmuir consistentes com aqueles descritos previamente na literatura usando cromatografia ou cintilografia.

Desenvolveu-se um método original de cromatografia a líquido em fase reversa automatizado por injeção sequencial para determinação de AMPA e glifosato. O método proposto é alternativo aos métodos mais comuns que são baseados em cromatografia de troca iônica. O sistema SIC foi eficiente na realização de duas etapas de derivatização (conversão de glifosato em glicina e conversão de glicina no derivado fluorescente por reação com OPA-MCE) e mostrou-se robusto na etapa de separação cromatográfica, sem apresentar vazamentos, graças à válvula seletora em aço inox com capacidade para trabalhar a pressões de até 5000 psi. A coluna monolítica empregada não apresentou sinais de perda de eficiência, mesmo com a frequente exposição a soluções de hipoclorito de cálcio, bem como o pH elevado do reagente OPA-ME (pH > 9,0).

As metodologias SIA ou SIC aqui apresentadas podem encontrar aplicabilidade em triagem de amostras, mas ainda precisam de aperfeiçoamentos, principalmente com a inclusão de etapas prévias de pré-concentração e minimização de interferências para, com isso, terem melhoradas as figuras de mérito analíticas de limites de detecção, quantificação, sensibilidade e seletividade.

Considerando-se que pequenas proporções do herbicida aplicado em lavouras podem atingir corpos d'água adjacentes, dependendo das características do solo, pouco efeito será exercido no declínio de populações dessas espécies de algas. Entretanto, deve ser considerada a possibilidade de eutrofização desses corpos d'água, causada pela estimulação de crescimento de microalgas expostas a pequenas doses de herbicidas. Os dados obtidos a partir do presente estudo dão subsídios para futuros estudos sobre fisiologia e bioquímica de outras espécies de plantas, bem como para estudos ambientais sobre a ciclagem de elementos que são dependentes do metabolismo de microorganismos afetados por xenobióticos.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABATE, G., LICHTIG, J., MASINI, J.C., Construction and evaluation of a flow-through cell adapted to a commercial static mercury drop electrode (SMDE) to study the adsorption of Cd(II) and Pb(II) on vermiculite, *Talanta* 58 3 (2002) 433-443.
- ABATE, G., PENTEADO, J.C., CUZZI, J.D., VITTI, G.C., LICHTIG, J., MASINI, J.C., Influence of humic acid on adsorption and desorption of atrazine, hydroxyatrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine onto a clay-rich soil sample, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6747-6754.
- ABDULLAH, M.P., DAUD, J., HONG, K.S., YEW, C.H., Improved method for the determination of glyphosate in water, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 363-369.
- ADOCK, J.L., BARNETT, N.W., GERARDI, R.D., LENEHAN, C.E., LEWIS, S.W., Determination of glyphosate mono-isopropylamine salt in process samples using flow injection analysis with tris(2, 2' -bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection, *Talanta* 64 (2004) 534-537.
- ALBERS, C.N., BANTA, G.T., HANSEN, P.E., JACOBSEN, O.S., The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil—comparing different soils and humic substances, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 2865-2870.
- ALDESUQUY, H.S., IBRAGHIM, A.H.A., The role of shikimic acid in regulation of growth, transpiration, pigmentation, photosynthetic activity and productivity of *Vigna sinensis* plants, *Phyton-Ann. Rei Botanicae* 40 (2000) 277-292.
- ALFERNESS, P.L., IWATA, Y., Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soil, plant and animal matrixes, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2751-2759.
- AMARANTE JR., O.P., DOS SANTOS, T.C.R., BRITO, N.M., RIBEIRO, M.L., Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação, *Quim. Nova* 25 (2002) 589 – 593

- ARMENTA, S., GARRIGUES, S., DE LA GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry, TrAC, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 497 - 511.
- ATKINS, P. W., MACEDO, H., Físico-Química 3, LTC 1999.
- BALTHAZOR, T.M., HALLAS, L.E., Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge, Appl Environ Microbiol 51 (1986) 432–434
- BARJA, B.C., Dos Santos Afonso, M., Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 585–592
- BARROW, M.G., Química-Física, 3ª edição, Reverté S.A., 1976.
- BARRY, G.F., KISHORE, G.M., Glyphosate tolerant plant. US Patent 5 (1998) 776 – 760
- BHASKARA, B.L., NAGARAJA, P., Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples, Helv. Chim. Acta 89 (2006) 2686 -2693.
- BOLOGNESI, C.; BONATTI, S.; DEGAN, P. GALLERANI, E.; PELUSO, M.; RABONI, R.; ROGGIERI, P.; ABBONDANDOLO, A. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 1957-1962
- BORGGAARD, O.K., GIMSING, A.L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to surface and ground waters: a review, Pest. Manag. Sci. 64 (2008) 441–456
- BOUTON, C, LEE, H.B, PEART, E.F, BATCHALER, P,S, MAGUIRE, R,J. Effects of the sulphonyl urea herbicide methylsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species, Environ Toxicol Chem 19 (2000) 2532- 2541
- BRAININA, K. H., Advances in voltammetry, Talanta 34 1 (1987) 41-50.

- BRONSTAD, J.O., FRIESTAD, H.O., Method for determination of glyphosate residues in natural Waters based on polarography of N-nitroso derivative, *Analyst* 101 (1976) 820 – 824
- BURNS, A.J., Liquid-chromatographic determination of glyphosate technical and its formulation - collaborative study, *J. AOAC Int.* 66 (1983) 1214–1219
- CARLISLE, S. M., TREVORS, J. T. Glyphosate in the environment, *Water Air Soil Pollut* 39 (1988) 409–420
- CEDERGREEN, N., OLESEN, C.F. Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96 (2010) 140-148
- CEDERGREEN, N., STREIBIG, J.C., KUDSK, P., MATHIASSEN, S.K., DUKE, S.O. The occurrence of hormesis in plants and algae, *Dose-Response* 5 (2007) 150-162
- CEDERGREEN, N., STREIBIG, J.C. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard, *Pest. Manag. Sci.* 61 (2005) 1152-1160
- CHOCHOLOOUS, P., SOLICH, P., SATINSKY, D. An overview of sequential injection chromatography, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 129 – 135
- CHRISTIAN, G.D. *Analytical Chemistry*, 5ª Edição John Wiley & Sons, EUA, 2003.
- CIKALO, M.G., GOODALL, D.M., MATTHEWS, W. Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection, *J. Chromatogr. A* 745 (1996) 189 - 200
- COLOMBO, S.M., MASINI, J.C. Developing a fluorimetric sequential injection methodology to study adsorption/desorption of glyphosate on soil and sediment samples, *Microchem. J.* 98 (2011) 260 – 266
- COLOMBO, S.M., MASINI, J.C. Propriedades ácido base e de complexação de ácidos húmicos e fúlvicos isolados de vermicomposto, *Quim. Nova* 30 (2007) 1261 – 1266
- CORBERA, M., HIDALGO, M. SALVADÓ, V., Extraction and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases, *Microchim. Acta* 153 (2006) 203 – 209

- DAHMEN, E. A. M. F., *Electroanalysis (Theory and applications in aqueous and non-aqueous media in automated chemical control)*, Elsevier, Amsterdam, 1986
- DE MARIA, N., BECERRIL, J.M., GARCIA-PLAZAOLA, J.I., HERNANDEZ, A., DE FELIPE, M.R., FERNANDEZ-PASCUAL, M. New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: role of shikimate accumulation, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 2621–2628.
- DELORENZO, M.E., SCOTT, G.I., ROSS, P.E., Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review, *Environ. Toxicol. Chem.* 20, (2001) 84–98.
- DICK, R.E., QUINN, J.P., Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation, *Appl Microbiol Biotechnol* 43 (1995) 545–550.
- DILL, G.M. Glyphosate resistant crops: history, status and future, *Pest Manag Sci* 61 (2005) 219-224
- DOMÍNGUEZ RENEDO, O., ALONSO-LOMILLO, M.A., ARCOS MARTÍNEZ, M.J. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta* 73 (2007) 202 – 219
- EBATO, M.; YONEBAYASHI, K.; KOSAKI, T. Predicting Freundlich adsorption isotherm of atrazine on Japanese soils, *Soil Sci. Plant Nutr.* 47 (2001) 221-231.
- EBERBACH, P.L., DOUGLAS, L.A., Method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil using electron capture gas chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 1776–1780.
- ECONOMOU, A., Sequential injection analysis (SIA): a useful tool for on-line sample handling and pre-treatment. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 416 - 425
- EPA 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, Cincinnati, OH, 1990.
- FALONE, Z.S., VIEIRA, E.M., Adsorção/dessorção do explosivo tetril em turfa e em argissolo vermelho amarelo, *Quim. Nova* 27 (6) (2004) 849 – 854.

- FARIA, A.M., BOTTOLI, C.B.G., JARDIM, I.C.S.F., COLLINS, C.H., Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas, *Quim. Nova* 29 (2) (2006) 300 – 309.
- FENG, J.C., THOMPSON, D.G., Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 2. Persistence in foliage and soils, *J Agric Food Chem* 38 (1990) 1118–1125.
- FINGLER, S., STIPIČEVIĆ, S., DREVENKAR, V., Sorption behaviour of chlorophenols and triazine herbicides in reference euro-soils, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 89-93.
- FORLANI, G., MANGIAGALLI, A., NIELSEN, E., SUARDI, C.M., Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for possible involvement of unculturable microorganisms, *Soil Biol Biochem* (1999) 31 991–997.
- FORLANI, G., PAVAN, M., GRAMEL, M., KAFARSKI, P., LIPOK, J., Biochemical basis for widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate, *Plant Cell Physiol* 49 (3) (2008) 443-456.
- FRANKLIN SMYTH, W., WATKISS, P., BURMICZ, J.S., HANLEY, H.O., A polarographic and spectral study of some C- and N- nitroso compounds, *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 81 – 92.
- FUNKE, T., HAN, H., HEALY-FRIED, M.L., FISCHER, M., SCHONBRUNN, E. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103 (2006) 13010–13015.
- GALHARDO, C.X., MASINI, J.C., Spectrophotometric determination of phosphate and silicate by sequential injection using the molybdenum blue chemistry, *Anal. Chim. Acta* 417 (2000) 191 - 200
- GALLI, A.J., MONTESUMA, M.C., *Alguns Aspectos da Utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura*, ACADCOM Gráfica e Editora (2005).
- GARCIA, A.F., ROLLEMBERG, M.C., Determinação voltamétrica do herbicida glifosato em águas naturais utilizando eletrodo de cobre, *Quim. Nova* 30 (2007) 1592 -1596
- GARP, Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas; Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (apostila), 1999

- GAVLICK, W.K., TOMKINS, D.F., An updated liquid chromatographic assay for the determination of glyphosate in technical material and formulations, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 1 – 4
- GAWLIK, B.M, KETTRUP, A., MUNTAU, H., Characterisation of a second generation of European reference soils for sorption studies in the framework of chemical testing —Part II: soil adsorption behaviour of organic chemicals, *Sci. Total Environ.* 229 (1999) 109-120.
- GENTY, B., BRIANTAIS, J.M., BAKER, N.R.1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta* 990 (1990) 87–92.
- GIANESSI, L.P. Economic and herbicide use impacts of glyphosate resistant. (2005)
- GILES, C. H., SMITH, D., HUITSON, A., A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *J. Colloid Interface Sci.* 47 (3) (1974) 755 – 765
- GLASS, R.L. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals, *J. Agric. Food Chem.* 35 (1987) 497 - 500.
- GLASS, R.L., Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals, *J. Agric. Food Chem.* 35 (1987) 497-500.
- GOMEZ, V., CALLAO, M.P., Multicomponent analysis using flow systems. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 767 – 774
- GREY, L., NGUYEN, B., YANG, P., Liquid chromatography/electrospray ionization/isotopic dilution mass spectrometry analysis of n-(phosphonomethyl) glycine and mass spectrometry analysis of aminomethyl phosphonic acid in environmental water and vegetation matrixes, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1770-1780.
- GUBELI, T., CHRISTIAN, G.D., RUZICKA, J., Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2407 – 2413
- GUILARD, R.R.L., RYTHER, J.H., Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husteds and *Detonula confervacea* cleve, *Can. J. Microbiol.* 8 (1962) 229 - 239

- GUILLARD, R.R.L., RYTHER, J.H., Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husteds and *Detonula confervacea* cleve, Can. J. Microbiol. 8 (1962) 229 - 239
- GUZMAN, M., POLEMA, C., RUZICKA, J., CHRISTIAN, G.D., Sequential injection technique for automation of complex analytical procedures: fluorimétrica assay of factor thirteen, Talanta 40 (1992) 81 – 87.
- HANCE RJ, Adsorption of glyphosate by soils, Pestic Sci 7 (1976) :363–366
- HANCZKÓ, R., MOLNÁR-PERL, I., Derivatization, stability and chromatographic behavior of *o*-phthaldialdehyde amino acid and amine derivatives: *o*-phthaldialdehyde/2-mercaptoethanol reagent, Chromatographia 57 (2003) S103 – 111
- HANKE, I., SINGER, H., HOLLENDER, J., Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 2265 - 2276.
- HART, M.R., QUIN, B.F., NGUYEN, M.L., Phosphorus runoff from agricultural land and direct fertilizer effects: a review, J. Environ. Qual. 33 (2004) 1954–1972
- HAWKINS, C.L., PATTISON, D.I., DAVIES, M.J., Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins, Amino Acids 25 (2003) 259 - 274.
- HAYAT, S., AHMAD, A., MOBIN, M., FARIDUDDIN, Q., AZAM, Z.M., Carbonic anhydrase, photosynthesis, and seed yield in mustard plants treated with phytohormones, Photosynthetica 39 (2001) 111–114.
- HERRMANN, K.M., WEAVER, L.M. The shikimate pathway. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50 (1999) 473–503.
- HUANG, J.L., SU, Z.C., XU, Y. The evolution of microbial phosphonate degradative pathways, J. Mol. Evol. 61 (2005) 682- 690.
- HUCLOVA, J., SATINSKY, D., KARLICEK, R., Coupling monolithic columns with sequential injection technique: a new separation approach in flow methods, Anal. Chim. Acta 494 (2003) 133 – 140

- INFANTE, C.M.C., MASINI, J.C. Development of a Spectrophotometric Sequential Injection Methodology for Online Monitoring of the Adsorption of Paraquat on Clay Mineral and Soil, *Spectroscopy Lett.* 40 (**2007**) 3 - 14.
- INFANTE, C.M.C., URIO, R.P., MASINI, J.C. Improving the detectability of sequential injection chromatography (SIC): Determination of triazines by exploiting liquid core waveguide (LCW) detection, *Anal. Let.* 44 (**2011**) 503 – 513
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia. Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGRE-008, Março de **2003**
- INTERNATIONAL ASSOCIATION OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY; Em Sample Handling of Pesticides in Water; Active: Barcelona, **1994**
- JACOB, G.S., GARBOW, J.R., HALLAS, L.E., KIMACK, N.M., KISHORE, G.M., SCHAEFER, J. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr, *Appl Environ Microbiol* 54 (**1988**) 2953–2958
- JACOBSEN, O.S., Degradation, sorption and persistence of glyphosate and the metabolite AMPA in a fractured Clay soil profile. *Proc XII Symp on Pesticide Chemistry*, Piacenza, Italy (**2003**).
- JAVARONI, R. de C. A., LANDGRAF, M. D., REZENDE, M. O. O., Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar, *Quím. Nova*, 22 (**1999**) 58-64.
- JIANG, J., LUCY, C.A., Determination of glyphosate using off-line ion exchange preconcentration and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection, *Talanta* 72 (**2007**) 113 - 118.
- JONG, H. de, JONG, L. W. de, Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loamsoil, *Chemosphere* 39 (**1999**) 753-763.

- JUANG, Ruey-Shin, SHIAU, Lih-Dong, Ion Exchange Equilibria of Metal Chelates of Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) with Amberlite IRA-68, Ind. Eng. Chem. Res. 37 (1998) 555-560.
- KARPOUZAS, D.G., SINGH, B.K.. Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis, Adv. Microb. Physiol. 51 (2006) 119-185
- KLUG, M., SANCHES, M. N. M., LARANJEIRA, M.C.M., FÁVERE, V.T., Análise das isotermas de adsorção de Cu(II), Cd(II), Ni(II) e Zn(II) pela n-(3,4-dihidroxibenzil) quitosana empregando o método da regressão não linear, Quim. Nova 21 4 (1998) 410 – 413.
- KOLPIN, D.W, THURMAN, E.M., LEE, E.A., MEYER, M.T., FURLONG, E.T., GLASSMEYER, S.T., Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States, Sci. Total. Environ. 354 (2006) 191–197.
- KONDA, L. N., CZINKOTA, I., FÜLEKY, G., MOROVJÁN, G., Modeling of Single-Step and Multistep Adsorption Isotherms of Organic Pesticides on Soil, J. Agric. Food Chem 50 (25) (2002) 7326-7331.
- KONONOVA, S.V., NESMEYANOVA, M.A., Phosphonates and their degradation by microorganisms, Biochemistry 67 (2002) 184–195.
- LECHÓN, Y., GARCÍA-VALCÁRCEL, A. I., MATIENZO, T., SÁNCHEZ-BRUNETE, C., TADEO, J. L. Comparison of analytical procedures for determination of soil sorption coefficients of some triazine herbicides, Commun. Soil Sci. Plant Anal. 28 19-20 (1997) 1835-1844.
- LEHOTAY, S.J., HARMAN-FETCHO, J.A., MCCONNELL, L.L., Agricultural pesticide residues in oysters and water from two Chesapeake bay tributaries, Mar. Pollut. Bull. 37 (1998) 32 – 44.
- LIPOK, J., STUDNIK, H., GRUYAERT, S. The toxicity of Roundup 360 SL formulation and its main constituents: glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs, Ecotoxicology and Environment Safety 73 (2010) 1681-1688.

- LIU, C.M., MCLEAN, P.A., SOOKDEO, C.C., CANNON, F.C., Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae, *Appl Environ Microbiol* 57 (1991) 1799–1804.
- MALLAT, E., BARCELO, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography–post-column derivatization with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 129 - 136
- MASINI, J.C., Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da análise por injeção sequencial, *Quim. Nova* 31 (2008) 704 -708
- MASINI, J.C., RIGOBELLO-MASINI, M., SALATINO, A., AIDAR, E., Bioprocess monitoring by sequential injection analysis, *Latin Am. Appl. Res.* 31 (2001) 463 – 468.
- MCCONNEL, J.S., HOSSNER, L.R., pH dependent adsorption isotherms of glyphosate, *J. Agric. Food Chem.* 33 (1985) 1075–1078
- MILES, C.J., MOYE, H. A., Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils, *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 486-491.
- MOLINA, M., SILVA, M. Simultaneous determination of phosphorus-containing amino acid-herbicides by nonionic surfactant micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis* 22 (2001) 1175 - 1181.
- MOORE, W., RABOCKAI, J., FERRONI, M.C.CHUN, H.L., *Físico-Química* 2, Edgard Blücher, 1968.
- MOREAU-KERVÉVAN, C., MOUVET, C., Adsorption and Desorption of Atrazine, Deethylatrazine, and Hydroxyatrazine by Soil Components, *J. Environ. Qual.* 27 (1998) 46-53.
- MOYE, H.A., BONING JR., A.J., Versatile fluorogenic labeling reagent for primary and secondary-amines - 9-fluorenylmethyl chloroformate, *Anal. Lett.* 12 (1979) 25-35.

- NOMURA NS AND HILTON HW, The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils, *Weed Res.* 17 (1977).113–121
- OLIVEIRA JR., R.S., KOSKINEN, W.C., Ferreira, F.A., Sorption and leaching potential of herbicides in Brazilian soils, *Weed Res.* 41 (2001) 97–110
- OSTERYOUNG, J. G., OSTERYOUNG, R. A., Square wave voltammetry, *Anal. Chem.*, 57 (1) (1985) 101A–110A
- PALCHETTI, I., LASCHI, S., MASCINI, M., Miniaturised stripping-based carbon modified sensor for in field analysis of heavy metals, *Anal. Chim. Acta* 530 (2005) 61 – 67
- PASQUINI, C., DE OLIVEIRA, W.A. Monosegmented system for continuous-flow analysis - spectrophotometric determination of chromium(vi), ammonia, and phosphorus, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2575-2579.
- PASTORE, P., LAVAGNINI, I., BOARETTO, A., MAGNO, F., Ion chromatographic determination of N-nitrosoglyphosate in a glyphosate matrix, *Anal. Chim. Acta* 230 (1990), 29 - 34.
- PATSIAS, J., PAPADOPOULOU, A., PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization, *J. Chromatogr. A* 932 (2001) 83 – 90.
- PAULL, B.; NESTERENKO, P.N. New possibilities in ion chromatography using porous monolithic stationary-phase media, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 295-303
- PENTEADO, J.C.P., RIGOBELLO-MASINI, M., LIRIA, C.W., MIRANDA, M.T.M., MASINI, J.C., Fluorimetric determination of intra- and extracellular free amino acids in the microalgae *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae) using monolithic column in reversed phase mode, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2827 – 2834
- PEREZ, G.L., TORREMORELL, A., MUGNI, H., RODRIGUEZ, P., VERA, M.S., DO NASCIMENTO, M., ALLENDE, L., BUSTINGORRY, J., ESCARAY, R., FERRARO, M., IZAGUIRRE, I., PIZARRO, H., BONETTO, C., MORRIS, D.P.,

- ZAGARESE, H. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study, *Ecol. Appl.* 17 (8) (2007) 2310–2322.
- PESSAGNO, R.C., SÁNCHEZ, R.M. T., AFONSO, M. dos S., Glyphosate behavior at soil and mineral-water interfaces, *Environ. Pollut.* 153 (2008) 53–59.
- PESSAGNO, R.C., TORRES SÁNCHEZ, R.M., DOS SANTOS AFONSO, M., , *Environ. Pollut.* 153 (2008) 53 - 59.
- PICCOLO ,A., CELANO, G., Hydrogen bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances, *Environ Toxicol Chem* 13 (1994) 1737–1741
- PICCOLO, A., CELANO, G., CONTE. P., Adsorption of glyphosate by humic substances, *J. Agric .Food Chem.* 44 (1996) 2442–2446.
- PIPKE, R., AMRHEIN, N., Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC13752, *Appl Environ Microbiol* 54 (1988) 1293–1296.
- PITELLI, R. A., em GALLI, A.J., MONTESUMA, M.C., *Alguns Aspectos da Utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura*, ACADCOM Gráfica e Editora (2005).
- PURRINGTON, C.B., BERGELSON, J., Exploring the physiological basis of costs of herbicide resistance in *Arabidopsis thaliana*, *Am. Nat.* 154 (1999) S82–S91.
- RAMALEY, L., KRAUSE Jr., M. S., Theory of square wave voltammetry, *Anal. Chem.* 41 (1969) 1362-1365
- RATCLIFF, A.W., BUSSE, M.D. AND SHESTAK, C.J. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forestsoils, *Appl. Soil Ecol.* 34 (2006) 114–124.
- RAVI, V., BALAKUMAR, H. (1998) Biodegradation of the C–P bond in glyphosate by the cyanobacterium *Anabaena variabilis*, *L. J. Sci. Ind. Res. India* 57 (1998) 790-794.
- REIS, B.F.; GINE, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A. Multicommutation in flow-analysis .1. binary sampling - concepts, instrumentation

- and spectrophotometric determination of iron in plant digests, *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 129-138.
- RELYEA, R.A., YUREWICZ, K.L. Predicting community outcomes from pairwise interactions: integrating density and trait mediated effects, *Oecologia* 131 (2002) 569-579
- RELYEA, RA. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities, *Ecological Applications* 15 (2) (2005) 618-627
- RIBANI, R., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C. H., JARDIM, I.C.S.F., MELO, L.F.C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quim. Nova* 27 (2004) 771 - 780
- RICHARD, C., COELHO, C., GUYOT, G., SHALOIKO, L., TRUBETSKOJ, O., Trubetskaya, O., Fluorescence properties of the < 5kDa molecular size fractions of a soil humic acid, *Geoderma* 163 (2011) 24 – 29
- RIGOBELLO-MASINI, M., PENTEADO, J.C.P., LIRIA, C.W., MIRANDA, M.T.M., MASINI, J.C., Implementing stepwise solvent elution in sequential injection chromatography for fluorimetric determination of intracellular amino acids in the microalgae *Tetraselmis gracilis*, *Anal. Chim. Acta* 628 (2008) 123 – 132
- ROCHA, F.R.P., RREIS, B.F., ZAGATTO, E.A., LIMA, J.L.F.C, LAPA, R.A.S., SANTOS, J.L.M. Multicommution in flow analysis: concepts, applications and trends, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 119 - 131
- ROY, D.N., KONOR, S.K., BANERJEE, S., CHARLES, D.A., Thompson, D.G., Prasad, R., Persistence, movement and degradation of glyphosate in selected Canadian boreal forest soils. *J Agric Food Chem* 37 (1989) 437–440.
- ROY, D.N., KONOR, S.K., Development of an analytical method for the determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid residues in soils by nitrogenselective gas chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 441-443.
- RUEPPEL, M.L., BRIGHTWELL, B.B., SCHAEFER, J., MARVEL, J., Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water, *J Agric Food Chem* 25 (1977) 517–528

- RUZICKA, J.; MARSHALL, G.D. Sequential injection-a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays, *Anal. Chim. Acta* 232 (1990) 329-343.
- SAFARPOUR, H., ASIAIE, R., Determination of Glyphosate as cross-contaminant in a commercial herbicide by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry, *Electrophoresis* 26 (2005) 1562-1566.
- SANTOS, L.B.O., ABATE, G., MASINI, J.C., Determination of atrazine by square wave voltammetry with the hanging drop Mercury electrode, *Talanta* 62 (2004) 667 – 674.
- SANTOS, L.B.O., INFANTE, C.M.C., MASINI, J.C., Development of a sequential injection chromatography (SIC) method for determination of simazine, atrazine and propazine, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 494 – 500.
- SANTOS, L.B.O., MASINI, J.C., Determination of picloram in natural Waters employing sequential injection square wave voltammetry using the hanging mercury drop electrode, *Talanta* 72 (2007) 1023 – 1029.
- SANTOS, L.B.O., SOLITRENICK, M.P.S., MASINI, J.C., Developing a sequential injection-square wave voltammetry (SI-SWV) method for determination of atrazine using a hanging Mercury drop electrode, *Anal. Chim. Acta* 528 (2005) 21 – 27.
- SATINSKY, D., HUCLOVA, J., SOLICH, P., KARLICEC, R., Reversed-phase porous silica rods, an alternative approach to high-performance liquid chromatographic separation using the sequential injection chromatography technique, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003a) 239 – 244.
- SATO, K., JIN, J.Y., TAKEUCHI, T., MIWA, T., SUENAMI, K., TAKEKOSHI, Y., KANNO, S., Integrated pulse amperometric detection of glufosinate, bialaphos and glyphosate at gold electrodes in anion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 313-320,
- SCHONHERR, J. A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes, *Pest Manag Sci* 58 (2002) 343-351.
- SEIBER, J.N., MCCHESENEY, M.M., KON, R., LEAVITT, R.A., Analysis of glyphosate residues in kiwi fruit and asparagus using high-performance liquid

chromatography of derivatized glyphosate as a cleanup step, J. Agric. Food Chem. 32 (1984) 678-681.

SILVA, M.S.P., MASINI, J.C., Exploiting monosegmented flow analysis to perform in-line standard addition using a single stock standard solution in spectrophotometric sequential injection procedures, Anal. Chim. Acta 466 (2002) 345 – 352.

SKOOG, D.A., CROUCH, S.R., HOLLER, F.J. Princípios de Análise Instrumental, 6ª edição, Bookman, 2009.

SODRÉ, F. F., LENZI, E., COSTA, A. C. S. da, Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos, Quim. Nova, 24 (3), (2001) 324-330.

SOUZA, D., CODOGNOTO, L., MALAGUTTI, A.R., TOLEDO, R.A., PEDROSA, V.A., OLIVEIRA, R.T.S., MAZO, L.H., AVACA, L.A., MACHADO, S.A.S., Voltametria de Onda Quadrada. Segunda parte: Aplicações, Quim. Nova 27 (2004) 790 – 797.

SOUZA, D., MACHADO, S.A.S., AVACA, L.A., Voltametria de onda quadrada.Primeira Parte: Aspectos Teóricos, Química Nova 26 (2003) 81-89.

SPRANKLE, P., MEGGITT, W.F., PENNER, D., Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil, Weed Sci. 23 (1975) 229–234.

STALIKAS, C.D., KONIDARI, C.N., Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. J. Chromatogr., A 907 (2001) 1-19.

SU, L.Y., DELACRUZ, A., MOORE, P.H., MARETZKI, A., The relationship of glyphosate treatment to sugar metabolism in sugarcane – new physiological insights, J.Plant Physiol. 140 (1992) 168–173.

TEIXEIRA, V. G., COUTINHO, F. M. B., GOMES, A. S., Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de Divinilbenzeno, Quim. Nova 24 (6), (2001) 808 – 818.

TEOFILO, R.F., REIS, E.L., REIS, C., DA SILVA, G.A., KUBOTA, L.T. Experimental design employed to Square Wave Voltammetry response optimization for the glyphosate determination, J. Braz. Chem. Soc. 15 (2004) 865 – 871.

- TERNAN, N.G., McGRATH, J.W., McMULLAN, G, QUINN, J.P. Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms, *World J. Microbiol. Biotech* 14 (**1998**) 635-647.
- TURIEL, E., PEREZ-CONDE, C., MARTIN-ESTEBAN, A., Assessment of the cross-reactivity and binding sites characterisation of a propazine-imprinted polymer using the Langmuir-Freundlich isotherm, *Analyst* **128** (**2003**) 137-141
- VAZ, C. M. P., CRESTANA, S., MACHADO, S. A. S., MAZO, L. H., AVACA, L. A., Adsorption isotherms for atrazine on soils measured by differential pulse polarography, *Electroanalysis* 9 12 (**1997**) 956–958.
- VELINI, E.D., ALVES, E., GODOY, M.C., MESCHÉDE, D.K., SOUZA, R.T., DUKE, S.O., Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth, *Pest Manag. Sci.* 64 (**2008**) 489–496.
- VENDRELL, E., GOMEZ, B.F., SABATER, C., CARRASCO, J.M. Effect of Glyphosate on Growth of Four Freshwater Species of Phytoplankton: A Microplate Bioassay, *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 82 (**2009**):538–542
- VERECKEN, H., Mobility and leaching of glyphosate: a review, *Pest.Manag. Sci.* 61 (**2005**) 1139-1151.
- VIEIRA DOS SANTOS, A.C., MASINI, J.C. Applying sequential injection analysis (SIA) and response surface methodology for optimization of Fenton-based processes, *Talanta* 77 (**2009a**) 1081 – 1086.
- VIEIRA DOS SANTOS, A.C., MASINI, J.C. A Sequential injection analysis (SIA) and response surface methodology: A versatile small volume approach for optimization of photo-Fenton processes, *Microchem. J.* 93 (**2009b**) 110–114.
- VIEIRA DOS SANTOS, A.C., Masini, J.C. A análise por injeção sequencial (SIA): vinte anos em uma perspectiva brasileira, *Quim Nova* 33 (**2010**) 1949 – 1956.
- VIEIRA DOS SANTOS, A., INFANTE, C.M.C., MASINI, J.C., Development of a spectrophotometric Sequential Injection Analysis (SIA) procedure for determination of ammonium: A Response Surface Methodology (RSM) approach, *Microchem. J.* 98 (**2011**) 97-102.

- VIEIRA, J.A., RAIMUNDO, I.M., REIS, B.F., ZAGATTO, E.A.G., LIMA, J.L.F.C. Sampling strategies in sequential injection analysis: Exploiting the monosegmented-flow approach, *Anal. Chim. Acta* 366 1-3 (**1998**) 257-262.
- WAUCHOPE, D. J., Acid dissociation constants of arsenic acid, methylarsonic acid (MAA), dimethylarsinic acid (cacodylic acid), and N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate), *J. Agric. Food Chem.* 24 (4) (**1976**) 717 – 721.
- WINFIELD, T.W., BASHE, W.J., BAKER, T.V., Determination of glyphosate in drinkingwater by direct-aqueous injection HPLC, post-column derivatization, and fluorescence detection, Method 547, U.S. Environmental Protection Agency, Ohio, 1990.
- WONG, P. Effects of 2,4-D Glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and Chlorophyll - a synthesis of *Scenedesmus quadriculata*, *Chemosphere* 41 (**2000**) 177-182.

CURRICULUM VITAE

Sandro de Miranda Colombo

Nascimento: São Paulo, 14 de janeiro de 1977.

OCUPAÇÃO: Professor na ETEC Vila dos Remédios.

EDUCAÇÃO:

ENSINO MÉDIO: Colégio “Nossa Senhora dos Remédios” – Osasco – SP. Conclusão: 1994.

Graduação 1: Faculdades Oswaldo Cruz – Bacharelado em Ciências com Habilitação em Química. Conclusão: 1998.

Graduação 2: Faculdades Oswaldo Cruz – Licenciatura em Ciências e Química. Conclusão: 1999.

Mestrado: Instituto de Química da Universidade de São Paulo – Química Analítica.

Título da Dissertação: "Isolamento, purificação e caracterização de substâncias húmicas isoladas de vermicompostos. Propriedades ácido-base e de complexação com íons Cu(II)". Início: 10/07/2002; Término: 11/11/2005. Financiamento CNPq.

PUBLICAÇÕES:

- ✓ ABATE, G., dos SANTOS, L. B. de O., COLOMBO, S. de M., MASINI, J.C. Removal of fulvic acid from aqueous media by adsorption onto modified vermiculite. Appl. Clay Sci. 32 (2006) 261 – 270
- ✓ ABATE, G. , dos SANTOS, L. B. de O., COLOMBO, S. de M., MASINI, J. C. Sequential Injection Analysis as a Tool for On-Line Monitoring the Sequential Injection Analysis as a Tool for On-Line Monitoring the Sorption of Fulvic Acid onto Modified Vermiculite. J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 491 – 496

- ✓ COLOMBO, S.M., MASINI, J.C. Propriedades ácido base e de complexação de ácidos húmico e fúlvico isolados de vermicomposto. Quim. Nova 30 (2007) 1261 – 1266
- ✓ COLOMBO, S.M., MASINI, J.C. Developing a fluorimetric sequential injection methodology to study adsorption/desorption of glyphosate on soil and sediment samples. Microchem. J. 98 (2011) 260 – 266

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS:

- ✓ 28ª Reunião Anual da SBQ, (2005), Sorção de Ácido Fúlvico por Vermiculita modificada. dos SANTOS, L. B. de O., COLOMBO, S. de M., MASINI, J. C.
- ✓ XVI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA, (2007), Determinação de glifosato empregando voltametria de onda quadrada associada à injeção sequencial após pré-concentração utilizando amberlite IRA – 68. COLOMBO, S. de M., SANTOS, L. B. de O. dos, MASINI, J. C.
- ✓ 33ª Reunião Anual da SBQ, (2010), Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em águas por Injeção Sequencial (SI) com detecção fluorimétrica. COLOMBO, S. de M., MASINI, J. C.
- ✓ 33ª Reunião Anual da SBQ, (2010), Influência do glifosato no crescimento e fluorescência fotossintética das microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetraselmis gracilis*. RIGOBELLO-MASINI, M. R., COLOMBO, S. de M., MASINI, J. C.
- ✓ 34ª Reunião Anual da SBQ, (2011), Metodologia fluorimétrica de análise por injeção sequencial para estudar adsorção e dessorção de glifosato em solo e sedimento. COLOMBO, S. de M., MASINI, J. C.
- ✓ 34ª Reunião Anual da SBQ, (2011), Determinação fluorimétrica de glifosato e AMPA por cromatografia líquida em fase reversa automatizada por injeção sequencial. COLOMBO, S. de M., MASINI, J. C.