Cláudia Flávia Breda Coutinho

**Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a
determinação do herbicida glifosato**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Dr. Luiz Henrique Mazo

São Carlos, 2008

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Luiz Henrique Mazo, pela orientação neste trabalho e pela confiança em mim depositada e também pela amizade.

Ao Doutorando Lincoln F. M. Coutinho, meu marido, pela paciência e companheirismo, pela colaboração e grande ajuda na elaboração desta tese.

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

Ao Professor Sergio A. S. Machado, pela amizade.

Ao Professor Doutor Luis A. Avaca, Laboratório GMEME, por ter cedido o cromatógrafo para a realização de parte dos experimentos.

Ao Professor Doutor Fernando M. Lanças, Laboratório CROMA, por ter cedido o laboratório para a realização de parte dos experimentos.

Ao Professor Doutor Carlos A. P. Camara e a Professora Doutora Suzana L. Nixdorf, da Universidade Estadual de Londrina - Departamento de Química, pela colaboração e por ter cedido o laboratório para a realização de parte dos experimentos.

Ao Sr. João Tiengo, pela confecção de todos os materiais que necessitei.

A todos os amigos do GMEME.

A CAPES pela bolsa concedida.

A CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho, são abordados os estudos relativos a interação entre Cu(II) e glifosato e também o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para determinação do herbicida glifosato. Inicialmente, o complexo Cu(II)-glifosato foi estudo por meio de técnicas espectrofotométricas e eletroanalíticas (voltametria de onda quadrada) e encontrou-se os valores de comprimento de onda máximo do complexo (231 e 731 nm) e também o valor da constante de estabilidade condicional do complexo 1:1 Cu(II)-glifosato ($\log K = 7,9$).

O estudo inicial da interação entre glifosato e o microeletrodo de cobre, em meio de tampão fosfato, mostrou que o herbicida dissolve a camada de óxidos, aumentando a corrente anódica do microeletrodo, levando a formação de um complexo solúvel entre Cu(II) e glifosato. Esta interação foi estudada por meio de técnicas voltamétricas, curvas de polarização, espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria hidrodinâmica, entre outras. Estes estudos complementares forneceram dados importantes sobre o processo de dissolução causado pelo glifosato, tais como, potencial de corrosão, densidade de corrente de corrosão e inclinação de Tafel, valores de resistência de transferência de carga e constante aparente de transferência eletrônica, coeficiente de difusão do complexo e constante de velocidade aparente da reação, além de imagens de microscopia eletrônica de varredura e de microscopia de força atômica do processo de corrosão do cobre.

Após estudar este processo de dissolução, esta reação foi utilizada para o desenvolvimento de uma metodologia de análise de glifosato utilizando detecção coulométrica com (micro)eletrodo de cobre aliada a cromatografia líquida. A instrumentação (software, célula eletroquímica e minipotenciostato) desenvolvida

neste trabalho foi utilizada com sucesso na determinação de glifosato em amostras de alimentos e água. As metodologias de análise de glifosato utilizando detecção coulométrica com (micro)eletrodo de cobre aliada a cromatografia líquida, apresentaram limites de detecção adequados para a análise deste herbicida em diversas matrizes ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ para sucos de frutas, $32 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$ para amostras de água e $53 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para amostras de soja). A detecção coulométrica com micro(eletrodo) de cobre apresentou algumas vantagens sobre a detecção com métodos ópticos, tais como, análise direta e rápida, ou seja, não são necessárias demoradas reações de derivatização da amostra; sem etapas de extração/limpeza da amostra; pré-concentração optativa; baixo custo das análises, quando comparado aos preços dos reagentes de derivatização e instrumentação simples e de baixo custo.

ABSTRACT

In this work, the interaction between Cu(II) and glyphosate was investigated and electroanalytical methodologies was developed for determination of this herbicide. Initially, the Cu(II)-glyphosate complex was studied through spectrophotometric and electroanalytical techniques (square wave voltammetry) and it was found the values of maximum wavelength of the complex (231 and 731 nm) and also the value for the constant of conditional stability of the 1:1 Cu(II)-glyphosate complex ($\log K = 7,9$).

The initial study of the interaction between glyphosate and the copper microelectrode, in phosphate buffer, showed that the herbicide dissolves the layers of oxides, increasing the anodic current of the microelectrode, taking the formation of a soluble complex between Cu(II) and glyphosate. This interaction was studied through cyclic voltammetry, polarization curves, electrochemical impedance spectroscopy, hydrodynamic voltammetry, among others. These complementary studies supplied important data about the electrode dissolution process caused by glyphosate, such as, corrosion potential, density of corrosion current and Tafel slope, resistance of heterogeneous charge-transfer reaction, diffusion coefficient of the complex and apparent rate constant of reaction, besides images of scanning electron microscopy and of atomic force microscopy of the corrosion process for metallic copper.

After studying the copper dissolution process, this reaction was used for the development of a new methodology for glyphosate analysis using coulometric detection with copper microelectrode allied to the liquid chromatography. The instrumentation (software, electrochemical cell and a minipotentostat) developed in this work was used with success in the determination of glyphosate in samples of foods and water. The methodologies of glyphosate analysis using coulometric

detection with copper microelectrode allied to the liquid chromatography, presented appropriate detection limits for the analysis of this herbicide in several matrixes ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ for fruit juices, $32 \mu\text{g L}^{-1}$ and $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$ for water samples and $53 \mu\text{g Kg}^{-1}$ for soy samples). The coulometric detection with copper microelectrode presented some advantages when compared with the detection with optical methods, such as, direct and fast analysis, in other words, it is not necessary derivatization reaction of the sample; without extraction/clean-up step of the sample; the sample pre-concentration is optional; low cost of the analyses, when compared to the prices of the derivatization reagents and simple and low cost instrumentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do herbicida glifosato. _____	3
Figura 2. Equilíbrios e constantes de dissociação do glifosato. _____	4
Figura 3. Sexto estágio da etapa que envolve a transferência do enolpiruvil do PEP para S3P. _____	5
Figura 4. Vias de degradação microbiológica do glifosato. _____	7
Figura 5. Foto digitalizada da célula eletroquímica feita em acrílico. _____	24
Figura 6. Instrumentação utilizada na determinação direta de glifosato em sucos de frutas utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada à detecção coulométrica com microeletrodo de cobre. _____	25
Figura 7. Foto digitalizada da célula eletroquímica para três eletrodos. _____	27
Figura 8. Instrumentação utilizada na determinação direta de glifosato e AMPA em amostras de água utilizando cromatografia por troca aniônica aliada à detecção coulométrica com eletrodo de cobre. _____	28
Figura 9. Foto digitalizada da célula eletroquímica acoplada ao mini-potenciostato. _____	30
Figura 10. Instrumentação utilizada na determinação direta de glifosato em soja utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada à detecção coulométrica com eletrodo de cobre. _____	31
Figura 11. Espectro da região do UV do complexo Cu(II)-glifosato em várias razões molares [glifosato]:[Cu(II)]. A [Cu(II)] nos complexos é 4×10^{-4} mol L ⁻¹ . As soluções possuem pH 5,5. _____	33
Figura 12. Espectro da região do visível do complexo Cu(II)-glifosato em várias razões molares [glifosato]:[Cu(II)]. A [Cu(II)] nos complexos é 4×10^{-4} mol L ⁻¹ . As soluções possuem pH 5,5. _____	34

- Figura 13. Voltamogramas de onda quadrada do complexo Cu(II)-glifosato. (■) $[Cu(II)] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (□) $[glifosato]:[Cu(II)] = 0,5$; (►) $[glifosato]:[Cu(II)] = 1,0$. As soluções possuem pH 5,5. Eletrólito suporte $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 . _____ 35
- Figura 14. Efeito do potencial limite sobre o voltamograma do microeletrodo de cobre em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5). Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$. ____ 40
- Figura 15. Efeito do pH da solução tampão fosfato sobre a resposta eletroquímica do glifosato. _____ 41
- Figura 16. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) na ausência (linha pontilhada) e na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato (linha cheia). Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$. _____ 42
- Figura 17. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão carbonato (pH 11,4) na ausência (linha pontilhada) e na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato (linha cheia). Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$. _____ 43
- Figura 18. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão borato (pH 9,4) na ausência (linha pontilhada) e na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato (linha cheia). Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$. _____ 44
- Figura 19. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (pH 13,0) na ausência (linha pontilhada) e na presença de $10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato (linha cheia). Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$. _____ 45
- Figura 20. Rotas para determinação de glifosato usando eletrodo de cobre. _____ 46
- Figura 21. Resposta eletroquímica do glifosato sobre microeletrodo de cobre em diferentes eletrólitos suporte. _____ 46
- Figura 22. Comparação das estruturas químicas das moléculas de glicina, de glifosato e de AMPA. _____ 47
- Figura 23. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato na ausência (linha pontilhada) e na presença (linha cheia): (a) de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicina, (b) de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato e (c) de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AMPA. Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$. _____ 48

- Figura 24. Comparação da linearidade das curvas de adição de padrão, obtidas para glicina, glifosato e AMPA. _____ 49
- Figura 25. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH: (a) glicina, (b) glifosato e (c) AMPA. _____ 51
- Figura 26. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH na ausência (linha pontilhada) e na presença (linha cheia): (a) de $1,81 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicina, (b) de $1,81 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato e (c) de $1,81 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AMPA. Velocidade de varredura $0,2 \text{ V s}^{-1}$. _____ 52
- Figura 27. Curvas de polarização obtidas para o microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5): (a) na ausência e (b) na presença de $1,92 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. _____ 54
- Figura 28. Diagramas de Nyquist do microeletrodo de cobre obtidos em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) (a) na ausência e (b) na presença de $1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. Potencial aplicado -20 mV , frequência 100 KHz a 220 Hz . ____ 55
- Figura 29. Circuito equivalente para o processo de dissolução da camada de óxidos na presença de glifosato. _____ 56
- Figura 30. Voltamogramas de varredura linear do eletrodo rotatório de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5). Concentração de glifosato: (a) 0; (b) 0,25; (c) 0,5; (d) 0,74; (e) 0,98; (f) 1,22 e (g) $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de rotação 625 rpm , velocidade de varredura 1 mV s^{-1} . _____ 58
- Figura 31. Influência da velocidade de rotação sobre a dissolução do eletrodo de cobre, na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura 1 mV s^{-1} . _____ 59
- Figura 32. Gráfico de Koutecký-Levich obtido para a reação de dissolução do cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5), na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. _____ 60
- Figura 33. Amperogramas hidrodinâmicos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) mostrando a resposta do eletrodo rotativo de cobre à adição de alíquotas de

glifosato. Velocidade de rotação 1000 rpm, potencial aplicado 0,05 V. [Glifosato]: (a) 2,48; (b) 4,95; (c) 7,4; (d) 9,8; (e) 12,2 e (f) $14,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. _____ 61

Figura 34. Micrografias de MEV mostrando a superfície do cobre (a) antes e depois da imersão por 4 dias em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) (b) na ausência e (c) na presença de $2,83 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. (d) placa de cobre após 14 dias em solução tampão fosfato na presença de $2,83 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Aumento: 5000x. _ 63

Figura 35. Análise de EDX das superfícies do cobre após a imersão por 4 dias em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) (a) na ausência, (b) na presença de $2,83 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato e (c) após 14 dias em tampão fosfato na presença de $2,83 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. _____ 64

Figura 36. Espectro de Uv-vis do complexo Cu(II)-glifosato formado em solução após 4 dias. _____ 66

Figura 37. Cronoamperogramas do eletrodo de cobre em tampão fosfato na ausência (a) e na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. Potencial aplicado=0,05 V, tempo 7200 s. _____ 67

Figura 38. (a) Imagem MEV e (b) análise de EDX do filme de fosfato de cobre formado sobre o eletrodo após a eletrólise. Imagens de MFA da superfície do eletrodo de cobre (c) antes e (d) após a eletrólise em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. Potencial aplicado= 0,05 V, tempo 7200 s. _____ 68

Figura 39. Espectro de Uv do complexo Cu(II)-glifosato formado a partir da interação entre CuO em pó e glifosato: (a) 0, (b) 20, (c) 50, (d) 100, (e) 200 e (f) 300 mg L^{-1} . pH das solução 3,3. _____ 69

Figura 40. Foto digitalizada das soluções filtradas após a interação entre CuO e glifosato. (A) solução tampão sem glifosato e (B) solução tampão com $1,7 \text{ g L}^{-1}$ de glifosato. _____ 70

Figura 41. Espectro da região do visível do complexo formado a partir da interação entre CuO em pó e glifosato. Solução tampão fosfato (pH 6,5) (A) sem e (B) com $1,7 \text{ g L}^{-1}$ de glifosato. _____ 70

- Figura 42. Painéis frontais do programa utilizado na detecção coulométrica com microeletrodo de cobre. (a) painel mostrando experimento *on-line*, (b) aplicação de filtros e (c) parâmetros experimentais. _____ 73
- Figura 43. Cromatograma de uma solução padrão de glifosato ($6,8 \text{ mg L}^{-1}$) e a curva analítica obtida utilizando a detecção coulométrica. Condições: fase móvel 30 mM tampão fosfato pH 6,8 : metanol [75:25 (v/v)], fluxo 1 mL min^{-1} , volume injeção $20 \mu\text{L}$, potencial aplicado $0,05 \text{ V}$. _____ 77
- Figura 44. Cromatograma de suco de tomate fortificado com $13,5 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato. Condições vide Figura 43. _____ 77
- Figura 45. Cromatogramas dos sucos de frutas fortificado com $6,8 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato (a) maçã e (b) uva. Condições vide Figura 43. _____ 78
- Figura 46. Painel frontal do programa mostrando o cromatograma *on-line* de uma mistura de AMPA ($55,5 \text{ mg L}^{-1}$) e glifosato ($8,4 \text{ mg L}^{-1}$). _____ 80
- Figura 47. Corte transversal da célula eletroquímica. _____ 80
- Figura 48. Visão explodida da cela desenvolvida. (Obs. As partes coloridas em verde possuem rosca). _____ 81
- Figura 49. Gráficos de superfície mostrando a relação entre tempo de retenção, concentração do tampão e pH da solução. [AMPA]= $55,5 \text{ mg L}^{-1}$ e [glifosato]= $8,4 \text{ mg L}^{-1}$, fluxo 1 mL min^{-1} , volume de injeção $20 \mu\text{L}$, potencial aplicado = $0,3 \text{ V}$. _____ 83
- Figura 50. Variação da resposta eletroquímica em função do potencial aplicado. Média de 5 injeções de uma solução padrão de glifosato ($8,4 \text{ mg L}^{-1}$). Fase móvel 50 mM de tampão fosfato (pH 6,8), fluxo 1 mL min^{-1} , volume de injeção $20 \mu\text{L}$. _____ 84
- Figura 51. Cromatogramas de um mistura de AMPA e glifosato obtidos com espaçadores de diferentes espessuras: (1) $0,5 \text{ mm}$, (2) $0,1 \text{ mm}$ e (3) $0,05 \text{ mm}$. Condições: Fase móvel 50 mM de tampão fosfato (pH 6,8), fluxo 1 mL min^{-1} , volume de injeção $20 \mu\text{L}$, [AMPA]= $55,5 \text{ mg L}^{-1}$ e [glifosato]= $8,4 \text{ mg L}^{-1}$. _____ 85

Figura 52. Curvas analíticas obtidas para o AMPA e glifosato utilizando a detecção coulométrica com eletrodo de cobre. Fase móvel 50 mM de tampão fosfato (pH 6,8), fluxo 1 mL min⁻¹, volume de injeção 20 µL. _____ 87

Figura 53. Cromatograma de uma amostra de água mineral fortificada com 6,9 mg L⁻¹ de AMPA e 8,5 mg L⁻¹ de glifosato. Condições vide Figura 52. _____ 88

Figura 54. Cromatogramas de uma amostra de água potável fortificadas com glifosato. (a) 500 µg L⁻¹ de glifosato antes da pré-concentração, (b) após a pré-concentração e (c) padrão de glifosato. _____ 89

Figura 55. Variação da área do pico cromatográfico em função do potencial aplicado. Média de 3 injeções de uma solução padrão de glifosato. Fase móvel 60 mM de tampão fosfato (pH 6,6), fluxo 1 mL min⁻¹, volume de injeção 20 µL. _____ 91

Figura 56. Cromatograma de uma solução padrão de glifosato (25 mg L⁻¹) e a curva analítica obtida utilizando a detecção coulométrica. Condições: fase móvel 60 mM tampão fosfato (pH 6,6), fluxo 1 mL min⁻¹, volume injeção 20 µL, potencial aplicado 0,4 V. _____ 92

Figura 57. Cromatograma de uma amostra de soja fortificada com 50 mg Kg⁻¹ de glifosato. Condições cromatográficas vide Figura 56. _____ 93

Figura 58. Cromatograma de uma amostra de soja fortificada com 10 mg Kg⁻¹ e 15 mg Kg⁻¹ de glifosato. Condições cromatográficas vide Figura 56. _____ 94

Figura 59. Gráfico de van't Hoff para o glifosato. Fase móvel: 60 mM de Tampão fosfato (pH 6,6), concentração de glifosato 10 mg L⁻¹, volume de injeção 20 µL, fluxo da fase móvel 1 mL min⁻¹ _____ 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do herbicida glifosato. _____	3
Tabela 2. Limite máximo de resíduo de glifosato em alguns alimentos. _____	8
Tabela 3. Procedência e pureza dos reagentes utilizados. _____	16
Tabela 4. Constantes de estabilidade de alguns complexos de Cu(II) formados com glicina, glifosato e AMPA. _____	50
Tabela 5. Parâmetros de corrosão obtidos para o microeletrodo de cobre. _____	53
Tabela 6. Valores experimentais de C , R_S e R_{TC} e k_{app} obtidos para a reação de dissolução do eletrodo de cobre. _____	56
Tabela 7. Concentração de Cu(II) e comprimento de onda máximo dos complexos formados em solução _____	62
Tabela 8. Dados estatísticos encontrados para 5 injeções sucessivas de uma mistura de AMPA e glifosato – repetibilidade da área do pico cromatográfico. ____	86
Tabela 9. Resultados dos ensaios de recuperação de glifosato em soja _____	95
Tabela 10. Dados estatísticos relativos aos experimentos de recuperação _____	96
Tabela 11. Avaliação da estabilidade do eletrodo de cobre a longo prazo _____	96
Tabela 12. Variação do tempo de retenção do glifosato em função da temperatura da coluna _____	97
Tabela 13. Comparação das metodologias de análise de glifosato utilizando detecção coulométrica com (micro)eletrodo de cobre _____	101
Tabela 14. Comparação das técnicas de análise do herbicida glifosato relatadas na literatura _____	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A	área geométrica do eletrodo (cm^2)
AMPA	ácido aminometilfosfônico
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
C	concentração (mol cm^{-3})
C_e	capacitância eletroquímica
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CG	cromatografia gasosa
D	coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
E_p	potencial de pico
$(E_p)_c$	potencial de pico do complexo
$(E_p)_M$	potencial de pico do metal não-complexado
EM	espectrometria de massa
EPSP	enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
EEC	Comunidade Econômica Européia
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ONU	Organização das Nações Unidas
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura
F	constante de Faraday
FMOC	9-fluorenilmetilcloroformato
IV	infravermelho
I_k	corrente cinética

I_d	corrente difusional
$\log K$	constante de estabilidade condicional do complexo
k	constante de velocidade aparente ($\text{cm mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)
k_{app}	constante aparente de transferência eletrônica (cm s^{-1})
n	número de elétrons envolvidos no processo
NDA	naptaleno-2,3-dicarboxaldeido
NBD-F	4-fluor-7nitro-2,1,3-benzoxadiazole
MFA	microscopia de força atômica
MEV-EDX	microscopia eletrônica de varredura e energia dispersiva de raios-X
OPA	o-ftalaldeído
PEP	fosfoenolpiruvato
RMN	ressonância magnética nuclear
R_s	resistência da solução
R_{TC}	resistência da transferência de carga
S3P	shikimato-3-fosfato
SPE	solid phase extration
TsCl	cloreto de p-toluenosulfonila
TFAA	ácido trifluoracético anidro
TFE	trifluoretanol
UV	ultravioleta
ν	viscosidade cinemática da solução ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
ω	velocidade de rotação (rad s^{-1})

SUMÁRIO

RESUMO	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>iii</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>v</i>
LISTA DE TABELAS	<i>xi</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	<i>xii</i>
1 Introdução	1
1.1 Herbicida glifosato	2
1.1.1 Modo de ação	4
1.1.2 Degradação do glifosato	5
1.1.3 Legislação	7
1.1.4 Toxidez	9
1.1.5 Complexos metálicos com glifosato	9
1.1.6 Metodologias de análise de glifosato	11
2 Objetivos	15
3 Parte Experimental	16
3.1 Materiais	16
3.1.1 Reagentes	16
3.1.2 Soluções	16
3.1.2.1 Solução estoque de glifosato	16
3.1.2.2 Solução estoque de ácido aminometilfosfônico (AMPA)	17
3.1.2.3 Solução estoque de glicina	17
3.1.2.4 Solução de KNO ₃	17
3.1.2.5 Solução de NaOH	17
3.1.2.6 Soluções tampão	17
3.1.2.7 Fase móvel 75:25 (v/v) 30mM de tampão fosfato (pH 6,8):metanol	18
3.1.2.8 Fase móvel tampão fosfato (pH 6,5-7,0)	18
3.2 Instrumentação e Metodologias	18

3.2.1	<i>Estudo da complexação entre glifosato e Cu(II)</i>	18
3.2.1.1	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível	18
3.2.1.2	Voltametria de onda quadrada e eletrodo de gota pendente de mercúrio	18
3.2.2	<i>Estudo do comportamento eletroquímico do glifosato sobre eletrodo de cobre</i>	19
3.2.2.1	Voltametria cíclica	19
3.2.2.2	Curva de polarização	19
3.2.2.3	Espectroscopia de impedância eletroquímica	20
3.2.2.4	Voltametria hidrodinâmica	20
3.2.3	<i>Efeito do herbicida glifosato sobre a dissolução (corrosão) do cobre</i>	20
3.2.3.1	Espectrofotometria de ultravioleta-visível	21
3.2.3.2	Espectroscopia de absorção atômica	21
3.2.3.3	Microscopia de força atômica (MFA)	21
3.2.3.4	Microscopia eletrônica de varredura e energia dispersiva de raios-X (MEV-EDX)	22
3.2.4	<i>Interação entre glifosato e óxido de cobre (CuO) em pó</i>	22
3.2.5	<i>Determinação direta de glifosato em suco de frutas utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada à detecção coulométrica com microeletrodo de cobre</i>	23
3.2.5.1	Sistema cromatográfico	23
3.2.5.2	Sistema de detecção eletroquímico	23
3.2.5.3	Preparo das amostras	24
3.2.6	<i>Determinação direta de glifosato e AMPA em água utilizando cromatografia por troca aniônica aliada à detecção coulométrica com eletrodo de cobre</i>	25
3.2.6.1	Sistema cromatográfico	26
3.2.6.2	Sistema de detecção eletroquímico	26
3.2.6.3	Preparo das amostras	27
3.2.7	<i>Desenvolvimento e validação de um método de análise de glifosato em soja utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada à detecção coulométrica com eletrodo de cobre</i>	28
3.2.7.1	Sistema cromatográfico	29
3.2.7.2	Sistema de detecção eletroquímico	29
3.2.7.3	Preparo das amostras	30
4	Resultados e Discussão	32
4.1	Estudo da complexação entre glifosato e Cu(II)	32
4.2	Comportamento eletroquímico do glifosato sobre eletrodo de cobre	37
4.2.1	<i>Voltametria Cíclica</i>	37
4.2.1.1	Soluções Tampão	37
4.2.1.2	Solução de NaOH	44
4.2.1.3	Comparação da resposta eletroquímica obtida nos diferentes eletrólitos suporte	45

4.2.1.4 Estudo comparativo do comportamento eletroquímico da glicina, do glifosato e do ácido aminometilfosfônico (AMPA)	47
4.2.2 Curva de polarização	53
4.2.3 Espectroscopia de impedância eletroquímica	54
4.2.4 Voltametria hidrodinâmica	57
4.3 Efeito do herbicida glifosato sobre a dissolução (corrosão) do cobre	61
4.3.1 Interação entre glifosato e CuO em pó	68
4.4 Determinação direta de glifosato em suco de frutas utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada à detecção coulométrica com microeletrodo de cobre	72
4.4.1 Desenvolvimento de instrumentação para a determinação direta de glifosato utilizando microeletrodo de cobre	72
4.4.2 Otimização do método de cromatografia de interação hidrofílica	73
4.4.3 Otimização da detecção coulométrica	75
4.4.4 Aplicação da cromatografia de interação hidrofílica com detecção coulométrica	76
4.5 Determinação direta de glifosato e AMPA em água utilizando cromatografia por troca aniônica aliada a detecção coulométrica com eletrodo de cobre	79
4.5.1 Desenvolvimento de uma célula eletroquímica do tipo thin-layer	79
4.5.2 Otimização do método de cromatografia por troca aniônica	82
4.5.3 Otimização da detecção coulométrica	84
4.5.4 Aplicação da cromatografia por troca aniônica com detecção coulométrica	86
4.6 Desenvolvimento e validação de um método de análise de glifosato em soja utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada a detecção coulométrica com eletrodo de cobre.	90
4.6.1 Otimização do método de cromatografia de interação hidrofílica	90
4.6.2 Otimização da detecção coulométrica	90
4.6.3 Aplicação da cromatografia de interação hidrofílica com detecção coulométrica	91
4.7 Comparação das metodologias de análise glifosato	99
5 Conclusões	104
6 Referências Bibliográficas	106
7 Produção Científica	114
7.1 Artigos publicados relacionados à Tese	114
7.2 Trabalhos completos publicados em anais de congressos relacionados à Tese	115

1 Introdução

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO-ONU) [1], pesticidas são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou armazenamento de alimentos. Eles são bioativos e capazes de prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis que, de alguma maneira, possam interferir na produção, processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos, produtos agrícolas em geral, madeira e produtos derivados de madeira.

Esta definição também compreende substâncias utilizadas no combate a insetos domésticos ou quaisquer agentes preventivos à ação de vetores de doenças que possam ser transmitidas ao homem ou animais domésticos como, por exemplo: febre amarela, doença de Chagas, malária, entre outras. Substâncias usadas como reguladoras no crescimento de plantas, agentes desfolhantes e dessecantes também são denominadas pesticidas [2]. Esses compostos podem ainda atingir o solo de forma indireta pela pulverização das partes verdes dos vegetais e pela queda de frutos e folhas que receberam a aplicação dos agrotóxicos e que são incorporados ao solo [3].

Assim, os defensivos agrícolas destinam-se a, em benefício da agricultura, alterar o balanço ecológico pela eliminação das espécies indesejáveis, a favor das espécies consideradas aproveitáveis para a continuação da existência humana. Entretanto, na própria natureza, caracterizada por tão variados processos biológicos e bioquímicos é pouco provável que mesmo compostos altamente específicos, deixem de afetar outros organismos além daquele ao qual se destinam na sua tarefa de controle de uma doença, praga ou erva daninha. Por isso, é importante verificar

quais as mudanças ecológicas que os defensivos podem produzir, e se essas mudanças são permanentes ou temporárias. Um perfeito conhecimento e compreensão do comportamento desses compostos nos solos e dos processos do solo que afetam os agrotóxicos torna-se assim, necessário, assim como são de utilidade métodos para controlar a persistência do defensivo e minimizar seus efeitos deletérios ao meio ambiente [3].

Nos tempos bíblicos, os exércitos usavam sal ou uma mistura de salmoura e cinzas para esterilizar alguns territórios que tinham conquistado na tentativa de torná-los inabitáveis para as gerações futuras do inimigo. Na primeira metade do século 20, foram usados vários compostos inorgânicos para eliminar ervas daninhas – principalmente arsenito de sódio, clorato de sódio e sulfato de cobre. Os dois últimos são exemplos de um grande número de sais anteriormente usados como pulverizadores herbicidas que matam plantas mediante a primitiva ação de extrair a água e desidratar as plantas, deixando ainda a terra agriculturável [4].

Finalmente, os derivados orgânicos do arsênio substituíram seus compostos inorgânicos como herbicidas, já que são menos tóxicos para os mamíferos. Em geral, os herbicidas inorgânicos e organometálicos foram gradualmente substituídos devido a sua persistência nos solos, sendo o mercado atualmente dominado pelos herbicidas totalmente orgânicos [4].

1.1 Herbicida glifosato

O glifosato é um herbicida sistêmico, pós-emergente e não seletivo largamente utilizado na agricultura [5]. O glifosato pertence ao grupo químico dos aminoácidos fosfonados e tal como seu precursor, a glicina, apresenta comportamento zwitteriônico. O glifosato é utilizado para o controle de plantas de

folhas largas anuais e perenes e pode ser usado nas entrelinhas de culturas de ameixa, cacau, café, citrus, maçã, nectarina, pêra, soja, uva, arroz, algodão, milho e em pastagens. Também pode ser empregado como dessecante em plantios diretos, como maturador de cana-de-açúcar e na eliminação de plantas aquáticas [6]. A fórmula estrutural do glifosato é mostrada na Figura 1.

Figura 1. Fórmula estrutural do herbicida glifosato.

As propriedades físico-químicas e toxicológicas do herbicida [7] estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do herbicida glifosato.

Propriedades	Características
<i>Aparência</i>	Sólido incolor
<i>Nomenclatura (IUPAC)</i>	[N-(fosfonometil)-glicina]
<i>Peso Molecular</i>	169,1 g mol ⁻¹
<i>Solubilidade em água</i>	12 g L ⁻¹ (20°C)
<i>Solubilidade em Solventes Orgânicos</i>	Insolúvel
<i>Ponto de Fusão</i>	200°C
<i>Pressão de Vapor (Pa)</i>	Desprezível
<i>Categoria Iônica</i>	Anfótero
<i>Classe Toxicológica</i>	III

Segundo Sprankle e colaboradores [8], o glifosato apresenta as seguintes constantes de dissociação: 0,8; 2,6; 5,6 e 10,6, como mostrado na Figura 2. Em pH 0,8, o glifosato apresenta carga líquida positiva, o que contribui para a sua adsorção

à argila e matéria orgânica do solo que têm cargas negativas. Em pH 2,6, o glifosato tem carga zero e acima deste valor, sua carga negativa aumenta com o aumento do valor de pH. Em pH 12, praticamente todo o glifosato está na sua forma trianiônica, sem nenhuma carga positiva.

Figura 2. Equilíbrios e constantes de dissociação do glifosato.

1.1.1 Modo de ação

O modo de ação do glifosato consiste na alteração de diferentes processos bioquímicos vitais nas plantas, como a biosíntese de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos [9]. O herbicida é absorvido pelo tecido vivo e translocado, via floema, através da planta para as raízes e rizomas, e sua ação inibe enzimas específicas como a enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase (EPSP) suspendendo a síntese de aminoácidos aromáticos que são precursores de outras substâncias

como alcalóides, flavonóides e lignina [6,10]. As plantas tratadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas, e devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive [6,11].

Em condições normais, na planta, a enzima EPSP catalisa a reação que envolve a transferência do enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o shikimato-3-fosfato (S3P) formando 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (Pi) [12]. Esta reação está representada na Figura 3.

Figura 3. Sexto estágio da etapa que envolve a transferência do enolpiruvil do PEP para S3P.

1.1.2 Degradação do glifosato

O termo degradação tem sido utilizado para a descrição de transformações de todo o tipo, incluindo aquelas que originam produtos mais tóxicos que os compostos iniciais, pela sua inativação, assim como aquelas responsáveis pela completa transformação até CO₂, H₂O, NO₃ e etc [3].

A degradação de pesticidas no solo pode ser por meios abióticos ou bióticos. A transformação abiótica ocorre quando a molécula é transformada pela ação de componentes físicos ou químicos do solo. O principal mecanismo de reação química na transformação de pesticidas no solo é a hidrólise. No solo, esta reação é

influenciada pela água, pelo valor de pH, temperatura e pela sorção do pesticida. É possível observar a fotodegradação da estrutura molecular de um pesticida na superfície do solo ou folha de uma planta quando ocorre a ação da luz.

A transformação biótica é feita por meio de microrganismos no solo. Na biodegradação de pesticidas estão envolvidos cinco processos: catabolismo, cometalismo, polimerização, acúmulo e efeitos secundários da atividade microbiana. A biodegradação ocorre em função da produção de enzimas por microrganismos degradadores, as quais em contato com estas moléculas, participam de uma série de reações como: oxidação, redução, hidrólise, metilação, etc [13].

No caso do glifosato, o principal meio de degradação é através de microrganismos do solo e da água, ou seja, biodegradação. Já que, para ocorrer a fotodegradação deste herbicida, este deveria possuir insaturação eletrônica para absorver radiação na região do ultravioleta com energia suficiente para romper ligações químicas [13]. Alguns autores relataram a fotodegradação catalítica de glifosato meio de oxalato de ferro [14], em solução aquosa com TiO_2 em pó [15], e em meio de $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ [16].

Existem duas vias principais de degradação microbiana do glifosato. A primeira via é pela clivagem da ligação C-P do glifosato, pela ação da enzima C-P liase, produzida pela bactéria *Agrobacterium radiobacter*, resultando sarcosina. Já a segunda via envolve a clivagem da molécula produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA) a partir da bactéria *Flavobacterium sp* [6,17]. Estas vias de degradação estão mostradas na Figura 4.

Uma característica importante do glifosato é a sua capacidade de ser adsorvido pelas partículas de solo e permanecer inativo até sua completa degradação. O glifosato é rapidamente degradado por microrganismos do solo,

sendo que sua meia-vida média (tempo médio necessário para que metade da quantidade aplicada do produto seja degradada) é de 32 dias. Esse resultado foi obtido em 47 estudos conduzidos em campos agrícolas e áreas de reflorestamento em diferentes localidades geográficas [18].

Figura 4. Vias de degradação microbiana do glifosato.

1.1.3 Legislação

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) estabeleceu o limite de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato em água potável, como limite considerado saudável [19]. Já a Comunidade Econômica Européia (EEC) estabeleceu com limite máximo individual de pesticidas $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, desde que a concentração total destas substâncias não ultrapasse $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ [6]. No Brasil, segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Portaria nº 518/2004 - o valor máximo permitido

de glifosato em água potável é de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ [20]. O CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) - resolução nº 357/2005 - estabeleceu um limite máximo de glifosato em águas de superfície igual a $65 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas classe 1 ou 2 e de $180 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas classe 3 [21]. (Classificação das águas - classe 1: abastecimento público após tratamento simples, recreação, irrigação de hortaliças e frutas e criação de espécies de consumo humano; -classe 2: difere da classe 1 pelo primeiro item: abastecimento público após tratamento convencional e classe 3: abastecimento público após tratamento convencional, irrigação de culturas arbóreas, cereais e forragens e dessedentação de animais.)

Em relação ao Limite Máximo de Resíduo (LMR) de glifosato em alimentos, a legislação, no Brasil, é estabelecida pela ANVISA. Outros órgãos governamentais internacionais, tais como, *Food and Agriculture Organization* (FAO) e EPA também estabeleceram limites máximos do herbicida em alimentos. A Tabela 2 apresenta os LMR de glifosato em alguns alimentos, segundo estes órgãos.

Tabela 2. Limite máximo de resíduo de glifosato em alguns alimentos.

Alimento	ANVISA (mg Kg ⁻¹)	FAO (mg Kg ⁻¹)	EPA (mg Kg ⁻¹)
Algodão	3	10	35
Ameixa	0,2	-	0,2
Arroz	0,2	0,1	100
Banana	0,02	0,05	0,2
Cana-de-açúcar	1,0	2,0	2,0
Feijão	0,05	2,0	100
Maçã	0,2	-	0,2
Milho	0,1	5,0	100
Uva	0,2	-	0,2
Citrus	0,2	1,5	0,5
Soja	10	20	20

1.1.4 Toxidez

O glifosato é absorvido via oral ou dérmica, sendo excretado principalmente pela urina. É irritante dérmico e ocular e pode causar danos hepáticos e renais, quando ingerido em doses altas. Entre os efeitos agudos e crônicos em seres humanos estão: dermatite de contato e síndrome tóxica, e após a ingestão de altas doses pode ocorrer: epigastralgia, ulceração ou lesão de mucosa gástrica, hipertermia, anúria, oligúria, hipotensão, conjuntivite, edema orbital, choque cardiogênico, arritmias cardíacas, edema pulmonar não cardiogênico, pneumonite, necrose tubular aguda, elevação de enzimas hepáticas, leucócitos, acidose metabólica e hipercalemia [6,11].

1.1.5 Complexos metálicos com glifosato

Os fosfonatos são moléculas que contêm um ou mais grupos $R-PO(OH)_2$. Estas moléculas possuem a habilidade de formar fortes complexos com metais. Todos os processos de adsorção, fotodegradação e biodegradação dos fosfonatos são modificados pela presença de metais devido a formação de complexos solúveis e não solúveis [22].

O glifosato possui três grupos funcionais (amino, carboxilato e fosfonato) que podem coordenar fortemente com íons metálicos especialmente com os de transição, em pH próximo de neutro, onde ambos os grupos carboxilato e fosfonato estarão desprotonados. A habilidade para se coordenar como um ligante tridentado coloca o glifosato numa posição única entre os herbicidas [23].

No solo, o glifosato compete com o fosfato inorgânico por sítios de adsorção, e se liga aos constituintes do solo pelo radical ácido fosfônico por um mecanismo similar ao do fosfato inorgânico. Matéria orgânica, hidróxidos amorfos de ferro e

alumínio e óxidos férricos são possíveis sítios de adsorção. A ligação do glifosato ao solo pode ser fortemente influenciada pela associação de cátions no solo [24]. Foi observado também que, a adsorção do glifosato pelo solo geralmente diminui com o aumento de pH do sistema, como resultado do aumento das cargas negativas de sua molécula e por consequência, maior repulsão entre as cargas negativas do solo e da molécula do herbicida [25]. Estudos recentes [26] mostram que a presença de glifosato influencia a adsorção de cobre no solo, e que solos ricos em óxido de ferro possuem grande adsorção de cobre na ausência de glifosato, sendo que esta adsorção diminui à medida que aumenta a concentração do herbicida.

Na literatura existem inúmeros trabalhos que abordam a síntese e caracterização de complexos metálicos com o glifosato [27]. Barja e colaboradores [22] sintetizaram complexos de ferro(III) e os caracterizaram por IV, plasma indutivamente acoplado e difração de raios-X. Heineke e colaboradores [28] caracterizaram complexos de metais (III), cobalto e cromo, através de difração de raios-X, espectroscopia de RMN de H e espectrofotometria de UV - visível.

Hoggard e Subramaniam [23] sintetizaram complexos de ferro(III), cobre(II), cálcio, sódio e magnésio e os caracterizaram por IV. Daniele e colaboradores [5] estudaram termodinâmica e espectroscopicamente complexos de cobre(II). Glass [9] estudou a formação de complexos de cádmio(II), cobre(II), chumbo(II) e zinco(II) através de UV-Vis, IV e polarografia.

Ptaszynski e colaboradores [29] sintetizaram e caracterizaram complexos de chumbo(II), cádmio(II) e zinco(II) através de IV, UV e análise térmica. Persson e colaboradores [30] fizeram estudos termodinâmicos e espectroscópicos de complexos de cádmio(II). Smith e colaboradores [31] prepararam e caracterizaram complexos de metais alcalinos terrosos através de difração de raios-x. Prenesti e

Gulmini [32] investigaram a complexação de níquel(II) através de titulação potenciométrica e UV. Sagatys e colaboradores [33] prepararam e caracterizaram complexos de amônio, lítio, sódio e prata através de IV e difração de raios-x. E por fim, Ptaszinski e Zwolinska [34] sintetizaram complexos de lantânio(III), cério(III), neodímio(III) e érbio(III) e caracterizaram por IV, difração de raios-X e análise térmica.

1.1.6 Metodologias de análise de glifosato

A molécula de glifosato apresenta propriedades que dificultam a sua determinação: caráter anfótero, alta solubilidade em meio aquoso, baixa solubilidade em solventes orgânicos, alta polaridade, baixa volatilidade e ausência de grupos cromóforos que absorvam na região do ultravioleta e visível.

Para a detecção de glifosato por métodos ópticos são necessárias reações de derivatização, ou seja, modificações em sua estrutura, com a introdução de grupos cromóforos ou fluorescentes. Embora em alguns casos, tais modificações sejam feitas nas etapas de extração, na maioria das vezes, os procedimentos de derivatização são realizados em etapas que antecedem (pré-coluna) ou procedem (pós-coluna) à separação cromatográfica [35].

Khrolenko e Wieczorek [36] publicaram um trabalho onde determinaram glifosato e o seu metabólito AMPA em amostras de suco de frutas utilizando CLAE e detecção por UV. Neste trabalho foi utilizada uma derivatização pós-coluna com o reagente TsCl. Outros trabalhos que relatam a detecção de glifosato por UV são os de Gavlick e Tomkins [37], Morovján e colaboradores [38] e Powell e colaboradores [39]. O limite de detecção para o glifosato com detecção por UV varia entre $10 \mu\text{g L}^{-1}$ a $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

A determinação de glifosato por fluorescência, certamente, é o método de detecção mais aplicado na análise cromatográfica devido à maior sensibilidade e seletividade, quando comparada à detecção por UV. Os reagentes de derivatização mais utilizados são OPA, FMOC e TsCl. Hidalgo e colaboradores [40] determinaram o glifosato e AMPA em águas naturais utilizando CLAE e detecção por fluorescência (derivatização pós-coluna com FMOC) e encontraram um limite de detecção de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$. Nedelkoska e Low [41] também determinaram glifosato em águas naturais, no entanto, eles utilizaram uma derivatização pré-coluna com FMOC, e obtiveram um limite de detecção de $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$. Outros trabalhos que relatam a detecção fluorimétrica de glifosato são os de Sancho e colaboradores [42], Abdullah e colaboradores [43] e Cowell e colaboradores [44].

Segundo a literatura [45] a determinação cromatográfica de glifosato com detecção por espectrometria de massa (EM) sem derivatização não apresenta boa sensibilidade. Börjesson e Torstensson [46] desenvolveram um método para a determinação de glifosato e AMPA em águas e solos utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Para a derivatização utilizou-se TFAA e TFE e obteve-se um limite de detecção igual a $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. Ibáñez e colaboradores [47] também determinaram glifosato em amostras de água e solo, contudo, utilizando CLAE acoplada a EM com ionização com eletrospray. O método envolveu a derivatização da molécula com FMOC, obtendo-se limites de detecção entre 5 ng L^{-1} (água) e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ (solo). Tseng e colaboradores determinaram glifosato e AMPA em soja utilizando cromatografia gasosa e detecção fotométrica com chama pulsada e obtiveram um limite de detecção igual a $0,02 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $0,03 \text{ mg Kg}^{-1}$, respectivamente.

A literatura apresenta alguns métodos de análise de glifosato que utilizam eletroforese capilar. Jiang e Lucy [48] determinaram glifosato utilizando fluorescência induzida a laser e obtiveram um limite de detecção de $0,27 \mu\text{g L}^{-1}$ (água). Chiu e colaboradores [49] analisaram glifosato utilizando quimiluminescência e obtiveram limite de detecção de $0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$ em soja. Outros métodos de detecção incluem condutividade [50], espectrometria de massa [51] e fluorescência indireta [52].

O glifosato também pode ser analisado utilizando o método ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). ELISA é um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos. Utilizando-se de um método de derivatização, pode-se transformar o glifosato em um antígeno e obter um anticorpo do mesmo. O teste se baseia na interação anticorpo-antígeno, onde os anticorpos atrelados a enzimas se unem aos antígenos os quais são detectados por uma reação colorida catalisada. Este método é utilizado principalmente na determinação de glifosato em águas com pouca ou nenhuma interferência de matriz. Gonzáles-Martinez e colaboradores [53] obtiveram limite de detecção para o glifosato de $0,021 \mu\text{g L}^{-1}$, já Rubio e colaboradores [54] encontraram um limite de detecção de $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Outros trabalhos onde o método ELISA é utilizado na determinação deste herbicida são os de Lee e colaboradores [55] (limite de detecção de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) e de Clegg e colaboradores [56] (limite de detecção de $76 \mu\text{g L}^{-1}$).

A análise de glifosato utilizando técnicas eletroanalíticas é pouco explorada. O glifosato não apresenta resposta eletroquímica direta em eletrodo de mercúrio, ou seja, é polarograficamente inativo, uma vez que não apresenta grupos químicos que possam ser reduzidos. Entretanto, Bronstad e Friestad [57,58] desenvolveram uma metodologia de análise de glifosato baseada na detecção de um derivado N-nitroso utilizando eletrodo de mercúrio. Neste método, a molécula de glifosato é derivatizada

através da reação com nitrito de sódio e ácido clorídrico. Como resultado, ocorre à introdução de um grupo N-nitroso no grupo amino secundário, o qual é facilmente reduzido e pode ser determinado polarograficamente. Recentemente, Teófilo e colaboradores [59] desenvolveram uma metodologia de análise de glifosato utilizando voltametria de onda quadrada, com o mesmo procedimento de derivatização descrito anteriormente. O limite de detecção para o glifosato utilizando esta reação de derivatização varia entre $25 \mu\text{g L}^{-1}$ a 1mg L^{-1} .

Em 2001, Sato e colaboradores [60] determinaram diretamente glifosato e outros herbicidas derivados de aminoácidos utilizando cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica pulsada integrada com eletrodo de ouro. A detecção amperométrica pulsada em eletrodos de metais nobres, como ouro ou platina, tornou-se uma das técnicas de detecção mais importantes em cromatografia, para a análise de carboidratos, aminoácidos, amins, etc. Esta técnica explora o processo catalítico que estas superfícies promovem. De acordo com os autores, os herbicidas estudados contêm grupos amino primário e secundário (glifosato), os quais podem ser oxidados em eletrodos de ouro sob condições alcalinas. Os herbicidas foram analisados com a mesma metodologia de análise de aminoácidos (já que são derivados e o comportamento eletroquímico é semelhante). O limite de detecção encontrado para o glifosato foi $51 \mu\text{g L}^{-1}$.

2 Objetivos

Estudar a complexação, em solução aquosa, entre glifosato e o íon Cu(II) por meio de técnicas eletroanalíticas e espectroscópicas.

Estudar a interação entre glifosato e o (micro)eletrodo de cobre, em meio de tampão, utilizando as técnicas de voltametria cíclica, curvas de polarização, espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria hidrodinâmica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectrofotometria Uv-visível.

Desenvolver uma instrumentação e uma metodologia eletroanalítica simples, rápida e de baixo custo para a determinação direta (sem reação de derivatização) de glifosato em amostras ambientais e/ou alimentos utilizando detecção coulométrica com (micro)eletrodo de cobre aliada a cromatografia líquida.

3 Parte Experimental

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

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

Tabela 3. Procedência e pureza dos reagentes utilizados.

Reagente	Procedência	Pureza
<i>Glifosato</i>	Milenia Agrociências	97%
<i>Ácido aminometilfosfônico</i>	Fluka	99,0%
<i>Glicina</i>	Mallinckrodt	100%
<i>Hidróxido de sódio</i>	Mallinckrodt	99,1%
<i>Fosfato de sódio dibásico, dodecahidratado</i>	J. T. Baker	99,7%
<i>Carbonato de sódio</i>	Mallinckrodt	100%
<i>Tetraborato de sódio, decahidratado</i>	Merck	99,5%
<i>Metanol</i>	J. T. Backer	Grau HPLC
<i>Acetonitrila</i>	J. T. Backer	Grau HPLC
<i>Ácido fosfórico</i>	Merck	85%
<i>Óxido de cobre CuO</i>	Carlo Erba	100%

3.1.2 Soluções

3.1.2.1 Solução estoque de glifosato

Preparou-se a solução estoque de glifosato na concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em água ultrapura (Milli-Q). As demais soluções foram preparadas por diluição da solução estoque.

3.1.2.2 Solução estoque de ácido aminometilfosfônico (AMPA)

Preparou-se a solução estoque de AMPA na concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em água ultrapura (Milli-Q). As demais soluções foram preparadas por diluição da solução estoque.

3.1.2.3 Solução estoque de glicina

Preparou-se a solução estoque de glicina na concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em água ultrapura (Milli-Q). As demais soluções foram preparadas por diluição da solução estoque.

3.1.2.4 Solução de KNO_3

Preparou-se a solução de KNO_3 na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,5) em água ultrapura (Milli-Q). O pH desta solução foi ajustado com uma solução diluída de KOH.

3.1.2.5 Solução de NaOH

Preparou-se a solução de NaOH na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em água ultrapura (Milli-Q).

3.1.2.6 Soluções tampão

Preparou-se a solução tampão carbonato na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 11,4) em água ultrapura (Milli-Q).

Preparou-se a solução tampão borato na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,4) em água ultrapura (Milli-Q).

Preparou-se a solução tampão fosfato na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,2) em água ultrapura (Milli-Q). As soluções tampão fosfato com diferentes valores de pH foram preparadas ajustando o pH da solução com ácido fosfórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.2.7 Fase móvel 75:25 (v/v) 30mM de tampão fosfato (pH 6,8):metanol

Preparou-se uma solução 30 mM de tampão fosfato (pH 6,8) a partir de diluição de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5). Depois, preparou-se uma fase móvel 75:25 (v/v) 30 mM de tampão fosfato (pH 6,8):metanol.

3.1.2.8 Fase móvel tampão fosfato (pH 6,5-7,0)

Preparou-se várias soluções com diferentes concentrações de tampão fosfato (pH 6,5-7,0) a partir de diluição de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5).

3.2 Instrumentação e Metodologias

3.2.1 Estudo da complexação entre glifosato e Cu(II)

3.2.1.1 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível

No estudo espectrofotométrico utilizou-se um espectrofotômetro Hitachi, modelo U-2010. As soluções foram preparadas com diferentes razões molares [glifosato]:[Cu(II)] (0,3, 0,5 0,8 e 1,0) e tiveram o pH justado para 5,5 com a adição de solução diluída de hidróxido de sódio. Foram realizadas varreduras no comprimento de onda entre 200 e 400 nm e ente 400 e 1000 nm, nas regiões do ultravioleta e do visível, respectivamente.

3.2.1.2 Voltametria de onda quadrada e eletrodo de gota pendente de mercúrio

No estudo eletroquímico empregou-se um analisador polarográfico EG&G PAR, modelo 394, e célula eletroquímica para três eletrodos. Usou-se um eletrodo de gota pendente de mercúrio como eletrodo de trabalho, fio de platina como eletrodo auxiliar e Ag/AgCl saturado como eletrodo de referência. Os parâmetros

utilizados na voltametria de onda quadrada foram: amplitude de pulso 20 mV, incremento de varredura 2 mV e frequência 100 Hz. Como eletrólito suporte usou-se 0,1 mol L⁻¹ KNO₃ (pH 5,5). Antes de cada experimento a solução na célula eletroquímica foi deaerada com N₂ durante 4 minutos.

3.2.2 Estudo do comportamento eletroquímico do glifosato sobre eletrodo de cobre

3.2.2.1 Voltametria cíclica

Para as medidas eletroquímicas de voltametria cíclica utilizou-se o analisador polarográfico EG&G PAR, modelo 174A. Os eletrodos de trabalho e auxiliar foram um microeletrodo de cobre (60 µm de diâmetro) e um eletrodo Ag/AgCl (saturado). Os eletrólitos suporte utilizados foram: solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH; 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato; 0,1 mol L⁻¹ de tampão carbonato e 0,1 mol L⁻¹ de tampão borato. Antes dos experimentos o microeletrodo de cobre foi polido em lixa 1500 e 4000 e em seguida lavado com água (este mesmo tratamento foi realizado nos outros experimentos, nos quais o microeletrodo de cobre foi utilizado).

Os diagramas de distribuição das espécies de glicina, glifosato e AMPA foram obtidos através do programa CurTiPot, disponível na internet [61].

3.2.2.2 Curva de polarização

As curvas de polarização foram realizadas em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5) utilizando um potenciostato-galvanostato Autolab, modelo PGSTAT30, um microeletrodo de cobre (60 µm de diâmetro) como eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência Ag/AgCl (saturado), e um fio de platina como eletrodo auxiliar. A cada 20 mV fez-se uma cronoamperometria por 5 minutos e registrou-se o último ponto de corrente e assim construiu-se a curva de polarização.

3.2.2.3 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica foi realizada em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5) utilizando um potenciostato-galvanostato Voltalab, um microeletrodo de cobre (60 µm de diâmetro) como eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência Ag/AgCl (saturado), e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Potencial aplicado -20 mV, e faixa de frequência de 100 KHz a 220 Hz.

3.2.2.4 Voltametria hidrodinâmica

A voltametria hidrodinâmica foi realizada em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5) utilizando um eletrodo rotatório de cobre (5 mm de diâmetro) controlado pelo sistema MSRX (Pine-Instruments), um eletrodo de referência Ag/AgCl (saturado), uma placa de platina (A = 1cm²) como eletrodo auxiliar e um potenciostato-galvanostato Autolab, modelo PGSTAT30. A velocidade angular do eletrodo rotatório variou de 400 a 3600 rpm. O eletrodo foi limpo com ácido nítrico diluído e lavado com água antes de cada série de medidas. Antes de cada medida o eletrodo foi pré-condicionado, aplicando um potencial de -0,250 V por 15 minutos.

3.2.3 Efeito do herbicida glifosato sobre a dissolução (corrosão) do cobre

Para estudar o efeito do herbicida glifosato sobre a dissolução do cobre, foram realizados experimentos com chapas de cobre (0,6 x 1,8 cm). Estas superfícies foram limpas com ácido nítrico diluído e água e em seguida estas chapas ficaram imersas por 4 dias em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5), na presença e na ausência de glifosato. Neste mesmo experimento, outra placa de cobre ficou imersa por 14 dias em uma solução de tampão fosfato na presença de glifosato,

para avaliar a dissolução por um período de tempo maior. A dissolução das placas de cobre foi avaliada diariamente para acompanhar a evolução do experimento.

Os experimentos cronoamperométricos foram realizados em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5) utilizando um potenciostato EG&G PAR, modelo 273A e uma célula eletroquímica para eletrólise de dois compartimentos. Os eletrodos utilizados foram uma chapa de cobre (área 1 cm²), um eletrodo de referência Ag/AgCl (saturado) e uma placa de platina (área 1cm²). Neste experimento, o potencial foi mantido constante a 0,05 V durante 7200 s.

3.2.3.1 Espectrofotometria de ultravioleta-visível

O espectro de UV-vis do complexo Cu(II)-glifosato formado durante os estudos de corrosão do cobre na presença de glifosato foi registrado usando um espectrofômetro Hitachi, modelo U-2010.

3.2.3.2 Espectroscopia de absorção atômica

Após os estudos de corrosão do cobre na presença de glifosato, a concentração de Cu(II) em solução foi medida utilizando um espectrômetro de absorção atômica Hitachi, modelo Z-8100 operando no comprimento de onda 324,8 nm.

3.2.3.3 Microscopia de força atômica (MFA)

Nos estudos da corrosão do cobre na presença de glifosato foi utilizado um microscópio de força atômica TopoMetrix Explorer.

3.2.3.4 Microscopia eletrônica de varredura e energia dispersiva de raios-X (MEV-EDX)

Nos estudos da corrosão do cobre na presença de glifosato utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura com energia dispersiva de raios-X LEO, Laica-Zeiss, modelo 440.

3.2.4 Interação entre glifosato e óxido de cobre (CuO) em pó

Dois experimentos foram realizados para avaliar a interação entre glifosato e óxido de cobre em pó. No primeiro experimento foram preparadas soluções de glifosato com concentrações entre 20 e 300 mg L⁻¹ e ajustou-se o pH para 3,3 com ácido sulfúrico diluído. Alíquotas de 50 mL destas soluções foram misturadas com 1g de CuO em pó e agitadas por 1 hora a 130 rpm. Após este período, as soluções foram filtradas e os espectros de Uv-vis foram obtidos.

No outro experimento, utilizou-se soluções de 50 mM de tampão fosfato (pH 6,5) com e sem glifosato (1,7 g L⁻¹). Alíquotas de 50 mL das soluções de tampão com e sem glifosato foram misturadas com 40 mg de CuO em pó e agitadas por 2 horas a 130 rpm. Após este período, as soluções foram filtradas e os espectros de Uv-vis foram obtidos e a quantidade de cobre em solução foi determinada por espectroscopia de absorção atômica com um espectrômetro Hitachi, modelo Z-8100 operando no comprimento de onda 324,8 nm.

3.2.5 Determinação direta de glifosato em suco de frutas utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada à detecção coulométrica com microeletrodo de cobre

Estes experimentos foram realizados no laboratório de Cromatografia–CROMA, no Instituto de Química de São Carlos, com a colaboração do doutorando Lincoln F. M. Coutinho.

3.2.5.1 Sistema cromatográfico

O sistema de cromatografia líquida utilizado neste trabalho consistiu de: uma bomba modelo LC-10AD (Shimadzu), um forno modelo CTO-10A (Shimadzu), um injetor com alça de amostragem de 20 μ L (Rheodyne, USA). A coluna utilizada foi uma Kromasil NH₂ (250 mm x 4,6 mm D. I., 5 μ m) da Alltech. A fase móvel utilizada foi tampão fosfato (30 mM pH 6,8)/metanol 75:25 (v/v). A fase móvel foi filtrada e desaerada com hélio. O fluxo utilizado foi 1 ml min⁻¹, a temperatura da coluna foi mantida a 40°C e a quantificação foi realizada utilizando a área do pico cromatográfico.

3.2.5.2 Sistema de detecção eletroquímico

O sistema de detecção eletroquímica utilizado incluiu um amplificador de corrente SR570 (Stanford Research System) e uma interface para aquisição e geração de sinal composta de uma placa multifunção PCI-6014B (National Instruments). A placa foi interfaciada a um microcomputador Pentium 4 1.4 GHz e o software, denominado *ED-Electrochemical Detection*, foi programado utilizando LabVIEW 7.1 (National Instrument).

Neste experimento, utilizou-se uma célula eletroquímica (tipo wall-jet) para dois eletrodos com um microeletrodo de cobre como eletrodo de trabalho e um tubo de aço-inox como pseudo-referência. A célula eletroquímica foi colocada em uma gaiola de Faraday para minimizar a interferência do ruído elétrico. Antes dos experimentos, o microeletrodo foi polido em lixa (1500 e 4000) mergulhado em ácido nítrico diluído e limpo com água. Na detecção coulométrica, o potencial do eletrodo foi mantido constante a 0,05 V. A Figura 5 mostra uma foto digitalizada da célula de acrílico e a Figura 6 apresenta a instrumentação utilizada neste experimento.

3.2.5.3 Preparo das amostras

Amostras de sucos de frutas foram obtidas no comercio local. A preparação da amostra foi muito simples: as amostras de suco foram fortificadas com uma quantidade apropriada de glifosato, centrifugadas (10.000 rpm, 10 min) e filtradas com membrana 0,22 μm (Millipore).

Figura 5. Foto digitalizada da célula eletroquímica feita em acrílico.

Figura 6. Instrumentação utilizada na determinação direta de glifosato em sucos de frutas utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada à detecção coulométrica com microeletrodo de cobre.

3.2.6 Determinação direta de glifosato e AMPA em água utilizando cromatografia por troca aniônica aliada à detecção coulométrica com eletrodo de cobre

Estes experimentos foram realizados no laboratório do Grupo DIA (Grupo de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação), no Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL), com a colaboração do Prof. Dr. Carlos A. P. Camara (UEL), da Profa. Dra Suzana L. Nixdorf (UEL) e do doutorando Lincoln F. M. Coutinho (CROMA-IQSC-USP).

3.2.6.1 Sistema cromatográfico

O sistema de cromatografia líquida utilizado neste trabalho consistiu de: uma bomba modelo LC-10AD (Shimadzu), um injetor com alça de amostragem de 20 μL (Rheodyne). A coluna utilizada foi uma SAX (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) (Agilent). A fase móvel utilizada foi tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 6,5). A fase móvel foi filtrada e desaerada com hélio. O fluxo utilizado foi 1 mL min^{-1} , a temperatura da coluna foi mantida a 24°C.

3.2.6.2 Sistema de detecção eletroquímico

O sistema de detecção foi composto por um amplificador de corrente modelo SR570 da Stanford Research System, um potenciostato PGSTAT30 (Autolab) e uma placa multifuncional PCI-6014B (National Instruments). Neste sistema, a aplicação do potencial fica a cargo do potenciostato (controlado pelo software GPES 4.9), enquanto a aquisição do sinal é realizada através dos conversores analógico-digital da placa PCI-6014B que estão conectados à saída do amplificador SR570 responsável pela amplificação e filtragem da corrente que circula pelo eletrodo de trabalho. O registro em disco do sinal é, por sua vez, realizado através do software ED (o mesmo da seção 3.2.4.2) utilizado um computador Pentium 4 1.4 GHz rodando LabVIEW 7.1 (National Instrument) em uma plataforma Windows XP.

Neste experimento, utilizou-se uma célula eletroquímica (tipo *thin-layer*, lab made) para três eletrodos com um eletrodo de cobre (3 mm de diâmetro) como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl saturado como eletrodo de referência e o corpo da célula de aço-inox como eletrodo auxiliar. A célula eletroquímica foi colocada em uma gaiola de Faraday para minimizar a interferência do ruído elétrico. Antes dos experimentos, o eletrodo foi polido em lixa (2000 e 4000), mergulhado em ácido nítrico diluído e limpo com água. Na detecção coulométrica, o potencial do

eletrodo foi mantido constante a 0,3 V. A Figura 7 mostra uma foto digitalizada da célula eletroquímica utilizada neste trabalho. A Figura 8 apresenta a instrumentação utilizada na determinação de glifosato e AMPA em amostras de água.

3.2.6.3 *Preparo das amostras*

A amostra de água mineral foi obtida no comercio local e a água potável foi obtida na própria universidade. As amostras de água foram filtradas em membrana 0,22 μm (Millipore) antes da injeção. A pré-concentração da amostra foi feita utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE) contendo fase estacionária de troca aniônica forte – SAX (Agilent). 100 mL de água de torneira foi fortificada com 500 ppb de glifosato e teve o pH ajustado para 9,2. A sorção desta solução no cartucho de SPE foi feita a uma velocidade de 8,7 mL min⁻¹. A dessorção (extração) foi feita com 5 mL uma solução de 50 mM de ácido fosfórico (pH 2,0) a uma taxa de 4 mL min⁻¹. O pH desta solução foi ajustado a 6,5 antes das injeções.

Figura 7. Foto digitalizada da célula eletroquímica para três eletrodos.

Figura 8. Instrumentação utilizada na determinação direta de glifosato e AMPA em amostras de água utilizando cromatografia por troca aniônica aliada à detecção coulométrica com eletrodo de cobre.

3.2.7 Desenvolvimento e validação de um método de análise de glifosato em soja utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada à detecção coulométrica com eletrodo de cobre

Estes experimentos foram realizados no laboratório GMEME (Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos), no Instituto de Química de São Carlos IQSC-USP, com a colaboração do doutorando Lincoln F. M. Coutinho (CROMA-IQSC-USP).

3.2.7.1 Sistema cromatográfico

O sistema de cromatografia líquida utilizado neste trabalho consistiu de: duas bombas modelo LC-10AT (Shimadzu), um forno modelo CTO-10A (Shimadzu), um desgaseificador DGU-14A (Shimadzu), um injetor com alça de amostragem de 20 μL (Rheodyne, USA). A coluna utilizada foi uma Luna NH_2 (250 mm x 4,6 mm D. I., 5 μm) da Phenomenex. A fase móvel utilizada foi 60 mM de tampão fosfato (pH 6,6). A fase móvel foi filtrada com membrana 0,22 μm . O fluxo utilizado foi 1 ml min^{-1} , a temperatura da coluna foi mantida a 30°C e a quantificação foi realizada utilizando a área do pico cromatográfico.

3.2.7.2 Sistema de detecção eletroquímico

O sistema de detecção foi composto por um amplificador de corrente modelo SR570 da Stanford Research System, um mini-potenciostato (*lab-made*) e uma placa multifuncional PCI-6221 (National Instruments). Neste sistema, a aplicação do potencial fica a cargo do potenciostato, enquanto a aquisição do sinal é realizada através dos conversores analógico-digital da placa PCI-6221 que estão conectados à saída do amplificador SR570 responsável pela amplificação e filtragem da corrente que circula pelo eletrodo de trabalho. O registro em disco do sinal é, por sua vez, realizado através do software ED (o mesmo da seção 3.2.4.2). Nos experimentos foi utilizado um computador Pentium 4 2.8 GHz operando LabVIEW 7.1 (National Instruments) em uma plataforma Windows XP. A alimentação do mini-potenciostato é realizada por meio de duas baterias de 9V.

Neste experimento, utilizou-se a mesma célula eletroquímica descrita na seção anterior. A célula eletroquímica foi colocada em uma gaiola de Faraday para minimizar a interferência do ruído elétrico. Antes dos experimentos, o eletrodo foi polido em lixa (2000 e 4000), mergulhado em ácido nítrico diluído e limpo com água.

Na detecção coulométrica, o potencial do eletrodo foi mantido constante a 0,4 V. A Figura 9 mostra uma foto digitalizada do mini-potenciostato acoplado a célula eletroquímica. A Figura 10 apresenta a instrumentação utilizada na determinação de glifosato em soja.

3.2.7.3 Preparo das amostras

A amostra de soja foi obtida no comercio local. 5 g de soja foram trituradas com 25 mL de água ultrapura por 1 minuto. O extrato foi centrifugado por 10 minutos a 3 000 rpm e filtrou-se o sobrenadante com membrana 0,22 μm antes da injeção.

Figura 9. Foto digitalizada da célula eletroquímica acoplada ao mini-potenciostato.

Figura 10. Instrumentação utilizada na determinação direta de glifosato em soja utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada à detecção coulométrica com eletrodo de cobre.

4 Resultados e Discussão

Neste capítulo serão mostrados os estudos realizados com o herbicida glifosato. Primeiramente, estudou-se a complexação entre Cu(II) e glifosato por meio de técnicas espectrofotométricas e eletroquímicas. Em seguida, o comportamento eletroquímico do glifosato sobre eletrodo de cobre foi investigado, utilizando técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica, curva de polarização, espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria hidrodinâmica. Realizou-se também um breve estudo sobre o efeito do glifosato sobre a corrosão (dissolução) do cobre. E por fim, serão apresentadas as metodologias eletroanalíticas para a determinação direta de glifosato utilizando detecção eletroquímica com eletrodo de cobre aliada à cromatografia líquida.

4.1 Estudo da complexação entre glifosato e Cu(II)

Para o estudo espectrofotométrico do complexo manteve-se fixa a concentração de Cu(II) e variou-se a de glifosato. As concentrações de Cu(II) utilizadas foram 4×10^{-4} mol L⁻¹ e 8×10^{-3} mol L⁻¹ para as regiões do UV e do visível, respectivamente. As razões molares do complexo [glifosato]:[Cu(II)] foram 0,3, 0,5, 0,8 e 1,0.

A Figura 11a e Figura 12a apresentam os espectros da molécula de glifosato nas regiões do UV e do visível. Pode ser observado nestas figuras que o glifosato não possui bandas de absorção, uma vez que não apresenta grupos cromóforos em sua estrutura que absorvam em comprimentos de onda maiores que 200 nm [60]. Assim, a detecção espectrofotométrica deste herbicida é possível somente com a derivação da molécula com a introdução de grupos capazes de absorver na região

do UV [62,63]. Contudo, pode-se utilizar uma metodologia de análise direta de glifosato, ou seja, sem derivatização, através da sua complexação com metais, tal como Cu(II) [27].

A Figura 11b mostra que o Cu(II) não absorve na região entre 200 e 400 nm. Todavia, quando foram adicionadas quantidades de glifosato na solução de Cu(II) (Figura 11c-5f) ocorreu o aparecimento gradual de um banda de absorção em aproximadamente 231 nm. Essa banda foi atribuída à transferência de carga ligante-metal, resultante da transferência de um elétron do grupo doador da molécula de glifosato para o Cu(II). É provável que o par de elétrons do grupo amino esteja envolvido nesse processo [9].

Figura 11. Espectro da região do UV do complexo Cu(II)-glifosato em várias razões molares [glifosato]:[Cu(II)]. A [Cu(II)] nos complexos é $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As soluções possuem pH 5,5.

A solução de Cu(II) apresentou banda de absorção em 812 nm na ausência de glifosato (Figura 12a), entretanto, na presença de glifosato (Figura 11c-6f) houve um deslocamento desta banda para 731 nm. Interpretou-se essa banda como uma

transição d-d, típica de muitos complexo de Cu(II) [5,9]. A intensidade de absorção também foi alterada pela presença do herbicida, resultando em um aumento de 4 vezes na absorbância, quando comparada ao Cu(II) não-complexado (Figura 12b).

Figura 12. Espectro da região do visível do complexo Cu(II)-glifosato em várias razões molares [glifosato]:[Cu(II)]. A [Cu(II)] nos complexos é 4×10^{-4} mol L⁻¹. As soluções possuem pH 5,5.

No estudo eletroquímico do complexo Cu(II)-glifosato utilizou-se a técnica de voltametria de onda quadrada, que constitui uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Quando se considera o uso de eletrodo mercúrio, a maior vantagem da voltametria de onda quadrada é a possibilidade de se promover varredura completa do potencial durante o tempo de vida de uma única gota de mercúrio. Isso reduz consideravelmente o tempo necessário para a realização do experimento [64,65].

O glifosato não apresenta resposta eletroquímica sobre eletrodo de mercúrio, ou seja, é polarograficamente inativo [59]. Contudo, esse herbicida pode ser detectado na forma de complexo metálico, mediante redução eletroquímica do

metal presente no complexo ($\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(0)}$ nesse caso), como o mostrado na Figura 13.

Figura 13. Voltamogramas de onda quadrada do complexo Cu(II)-glifosato. (■) $[\text{Cu(II)}] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (□) $[\text{glifosato}]:[\text{Cu(II)}] = 0,5$; (►) $[\text{glifosato}]:[\text{Cu(II)}] = 1,0$. As soluções possuem pH 5,5. Eletrólito suporte $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 .

Como pode ser observado na Figura 13, o Cu(II), na ausência de glifosato, apresentou E_p igual a 0,034 V. Entretanto, quando se adicionou uma concentração de glifosato equivalente a metade da concentração de Cu(II) (razão $[\text{glifosato}]:[\text{Cu(II)}] = 0,5$) apareceu um novo pico com E_p em aproximadamente -0,200 V e ocorreu diminuição na intensidade da corrente de pico do Cu(II) não-complexado. Para a razão molar igual a 0,5 existiram dois picos voltamétricos, um referente ao Cu(II) não complexado ($E_p = 0,034 \text{ V}$) e o outro referente ao Cu(II) complexado pelo glifosato ($E_p = -0,200 \text{ V}$). No voltamograma da solução que continha razão molar $[\text{glifosato}]:[\text{Cu(II)}] = 1$ observou-se que o pico referente ao Cu(II) não-complexado desapareceu, e que a intensidade da corrente de pico referente ao

complexo aumentou. Pode-se dizer que nessa razão molar todo Cu (II) encontra-se na forma de complexo.

Conhecendo os E_p do Cu(II) complexado e não complexado pode-se estimar a constante de estabilidade condicional do complexo, utilizando a equação de Nernst [66]:

$$(E_p)_C - (E_p)_M = \frac{-0,0592}{n} \log K$$

Onde $(E_p)_C$ é o potencial de pico do Cu(II) complexado, $(E_p)_M$ é o potencial de pico do Cu(II) não complexado, n é o número de elétrons e $\log K$ é a constante de estabilidade condicional do complexo.

Substituindo estes termos pelos valores encontrados neste trabalho obteve-se a constante de estabilidade condicional do complexo na razão molar 1:1 Cu(II)-glifosato igual a $\log K = 7,9$. Morillo e colaboradores [67] utilizaram eletrodo de gota pendente de mercúrio e voltametria de redissolução anódica e determinaram a constante de estabilidade condicional do complexo, (na presença de excesso de glifosato) igual a $\log K = 4,1$; os autores não determinaram o $\log K$ na razão molar 1:1 Cu(II):glifosato.

A determinação de glifosato pode ser realizada por meio de reação de complexação com Cu(II), já que este complexo é forte e possui grande estabilidade. Desta forma, estudou-se também a interação entre um eletrodo de cobre e glifosato, com o objetivo de desenvolver uma metodologia de análise direta deste herbicida. A seguir são mostrados tais resultados.

4.2 Comportamento eletroquímico do glifosato sobre eletrodo de cobre

4.2.1 Voltametria Cíclica

4.2.1.1 Soluções Tampão

Nas décadas de 80 e 90 foram publicados vários trabalhos os quais utilizavam o eletrodo de cobre, e também suas ligas, para a determinação de compostos alifáticos polares, como aminas [68,69], carboidratos [70,71], álcoois [68] e aminoácidos [72]. Além da sua utilização na determinação de compostos alifáticos polares através da oxidação dos mesmos, o eletrodo de cobre também pode ser utilizado em determinações de substâncias complexantes em condições nas quais tais analitos não sofram qualquer processo redox [73-76]. A literatura trás alguns trabalhos, principalmente na determinação de aminoácidos [73,74], onde este eletrodo possibilita a análise de tais substâncias.

Quando o eletrodo de cobre é polarizado em potencial positivo, um filme de óxido de cobre é formado na sua superfície. Primeiro, uma camada compacta de Cu_2O é formada e então uma camada amorfa formada por Cu_2O , CuO e pequenas quantidades de sais de cobre (estas dependem da composição da solução) formam-se sobre o eletrodo. Esta camada amorfa é muito mais solúvel e assim se mantém uma espessura constante do filme, quando a oxidação do cobre é contrabalanceada com a dissolução do CuO [68]. Na presença de compostos formadores de complexos estáveis com Cu(II) , a solubilidade desta camada de óxido aumenta [77]. Sabe-se também que o eletrodo de cobre só responde à presença de substâncias complexantes em meio com $\text{pH} < 6,0$ e, que depende fortemente do tipo do eletrólito

suporte (alta sensibilidade de tampão fosfato e carbonato e baixa sensibilidade e tampão borato) [68,72,73, 76,78,79].

A resposta eletroquímica do eletrodo de cobre, na presença destes agentes complexantes, resulta da interação entre estas substâncias e os íons Cu(II) contidos na camada de óxidos (os quais são provenientes da dissolução natural da camada de óxidos – reação 2), ou mesmo da interação direta entre os complexantes e a camada de óxidos de cobre (reação 1) na superfície do eletrodo. Os complexantes dissolvem a camada do óxido de cobre, deslocando o equilíbrio da reação de formação do óxido no sentido dos produtos (princípio de Le Chatelier), o que resulta em um aumento da corrente anódica do eletrodo (maior formação de óxido). O aumento da corrente anódica do eletrodo de cobre é proporcional a concentração do agente complexante contida na solução e também depende do poder complexante da substância.

A alta permeabilidade da camada de óxido formada em tampão fosfato torna possível a complexação entre Cu(II) e os ligantes. Kok e colaboradores [73] observaram que a formação de complexos entre Cu(II) e aminoácidos, a partir da dissolução do cobre, era mais rápida em tampão fosfato e carbonato quando comparada ao tampão borato. Uma possível causa desta diferença entre os tampões está associada a estrutura do óxido formada sobre a superfície do eletrodo – onde íons Cu(II) formados pela reação no eletrodo podem difundir pela camada de óxidos facilitando a complexação – assim o grau de permeabilidade da camada de

óxidos determinaria a velocidade da cinética da reação de dissolução do eletrodo (alta velocidade para tampões fosfato e carbonato e baixa velocidade para o tampão borato).

Outro estudo [80] mostrou que a camada de óxido formada em tampão fosfato e em tampão carbonato continha traços de P e C, respectivamente; entretanto, nenhum traço de B foi encontrado na camada de óxidos formada em tampão borato. Desta forma, a alta permeabilidade dos óxidos formados em tampão fosfato e tampão carbonato, quando comparada ao tampão borato, está relacionada a incorporação de fosfato de cobre e carbonato de cobre, respectivamente, na camada de óxidos de cobre. Assim, a sensibilidade do eletrodo de cobre para substâncias complexantes é mais alta em tampões fosfato e carbonato quando comparada à sensibilidade obtida em tampão borato.

A magnitude da resposta eletroquímica do eletrodo de cobre, na presença de substâncias complexantes, depende de um número de parâmetros [68]:

(a) Termodinâmico:

- Estabilidade do complexo formado entre Cu(II) e a substância complexante;

(b) Cinéticos:

- Velocidade de formação e dissolução da camada de óxidos;
- Velocidade de transporte da substância complexante em solução;
- Velocidade de transporte da substância complexante e do Cu(II) na camada porosa do filme de óxidos;
- Velocidade de formação do complexo.

Um aumento do conteúdo de solvente orgânico leva a uma pronunciada diminuição na velocidade da reação de complexação, refletindo desta maneira em

uma diminuição da sensibilidade. Este efeito é, aparentemente, devido a diminuição da constante de velocidade para reações iônicas, na presença de solventes orgânicos. Por outro lado, o efeito da força iônica mostrou-se menor e a presença do oxigênio dissolvido na solução não afeta a detecção eletroquímica [68].

A eletroquímica da superfície do cobre é bastante complexa, uma vez que, variando apenas o potencial limite da varredura, observa-se um deslocamento do potencial de redução da camada de óxidos, como pode ser observado na Figura 14. Pode ser observado que, quanto menor o valor do potencial limite da varredura, menores serão a corrente e o potencial de redução da camada de óxidos. Este fenômeno foi associado a compactação da camada de óxidos (Cu_2O e CuO), ou seja, quanto maior o potencial limite maior será a compactação da camada de óxidos e maior o seu efeito sobre o potencial e a corrente de redução [81].

Figura 14. Efeito do potencial limite sobre o voltamograma do microeletrodo de cobre em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5). Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

O glifosato é muito conhecido por sua habilidade complexante, principalmente na formação de complexos com metais de transição. A molécula deste herbicida possui três grupos funcionais (amino, carboxilato e fosfonato) que podem coordenar com o Cu(II). Assim, a detecção eletroquímica utilizando eletrodo de cobre pode ser utilizada para a determinação deste herbicida. Na literatura, o tampão fosfato com pH entre 6,5 e 7,4 é o eletrólito suporte mais utilizado para determinação de substâncias complexantes. Neste trabalho estudou-se a solução tampão fosfato com diferentes valores de pH: 6,0; 6,5; 7,1; 8,0 e 9,4, e obteve-se uma maior sensibilidade com valores de pH entre 6,5 e 7,1 (Figura 15).

Figura 15. Efeito do pH da solução tampão fosfato sobre a resposta eletroquímica do glifosato.

A Figura 16 mostra os voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5), na ausência e na presença de 1,45 x 10⁻³ mol L⁻¹ de glifosato. Na ausência de glifosato (linha pontilhada), foi observada a formação do filme de óxidos entre -0,132 e 0,12 V e posterior estabilização da corrente até 0,7 V, já na varredura negativa o pico em -0,15 V foi atribuído a redução

do óxido na superfície. Na presença de glifosato (linha cheia), um considerável aumento na corrente anódica foi observado, na varredura positiva, na faixa de -0,15 a 0,7 V, devido a dissolução da camada de óxidos causada pelo glifosato (e formação do complexo glifosato-Cu(II)). Na varredura negativa, observa-se um pequeno deslocamento do potencial e uma diminuição drástica da corrente de redução dos óxidos. Estas variações no comportamento catódico estão, provavelmente, associadas a solubilização parcial do óxido de cobre presente na superfície do eletrodo.

Figura 16. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) na ausência (linha pontilhada) e na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato (linha cheia). Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

A fim de comparar o comportamento voltamétrico do glifosato sobre o microeletrodo de cobre em diferentes tampões, realizou-se voltametrias cíclicas em tampão carbonato (Figura 17) e em tampão borato (Figura 18).

A Figura 17 apresenta os voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão carbonato (pH 11,4), na ausência e na presença de $1,45 \times$

$10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. Na ausência do herbicida (linha pontilhada), pode ser observada a formação de óxidos de cobre na região entre -0,18 e 0,8 V (região anódica) e a redução dos mesmos para Cu(I) e Cu(0) em -0,44 e -0,76 V, respectivamente. Já na presença de glifosato (linha cheia), observou-se na varredura positiva, um grande aumento da corrente anódica na região de formação de óxidos, relativo a reação de dissolução do óxido. Na varredura negativa, foi observada uma diminuição corrente e deslocamento de potencial de redução dos óxidos, tal como mostrado para o tampão fosfato.

Figura 17. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão carbonato (pH 11,4) na ausência (linha pontilhada) e na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato (linha cheia). Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

A Figura 18 mostra os voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão borato (pH 9,4), na ausência e na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. Na região entre -0,18 e 0,9 V observou-se a formação da camada de óxidos de cobre, já os picos em -0,31 e -0,65 V foram relacionados a redução dos mesmos. Quando o glifosato esteve presente na solução, houve um pequeno

aumento da corrente anódica do microeletrodo de cobre (quando comparado aos outros tampões). Tal como observado anteriormente, a presença de glifosato também diminuiu a corrente e deslocou o potencial de redução dos óxidos.

Figura 18. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão borato (pH 9,4) na ausência (linha pontilhada) e na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato (linha cheia). Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

4.2.1.2 Solução de NaOH

Os voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em solução de NaOH na ausência e na presença de glifosato são mostrados na Figura 19. O voltamograma cíclico obtido na ausência de glifosato (linha pontilhada) está de acordo com a literatura [72,82], exibindo ondas anódicas em -0,35 e -0,115 V, correspondendo a formação do óxido de cobre(I) e óxido de cobre(II) e ondas catódicas em -0,55 e -0,83V, correspondendo a redução dos óxidos.

Em meio fortemente alcalino (pH > 13,0), o cobre pode catalisar a reação de oxidação de glifosato por meio da formação da espécie de Cu(III) que atua como um mediador redox entre o analito e o eletrodo [72]. Na presença de glifosato (linha

cheia), o voltamograma apresenta um aumento da corrente anódica na região entre 0,47 e 0,74 V, que está associada a oxidação catalítica da molécula de glifosato; e possivelmente o grupo amino da molécula esteja diretamente envolvido na oxidação, por meio de um mecanismo semelhante ao relatado por Luo e colaboradores [72].

Na região de formação de óxidos entre -0,155 e 0,194V observa-se também um aumento de corrente anódica, que está relacionada à reação de dissolução do óxido (como já discutido na seção anterior).

Figura 19. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (pH 13,0) na ausência (linha pontilhada) e na presença de $10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato (linha cheia). Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

4.2.1.3 Comparação da resposta eletroquímica obtida nos diferentes eletrólitos suporte

A Figura 20 mostra um resumo das rotas de determinação de glifosato e a Figura 21 a apresenta a comparação da resposta eletroquímica deste herbicida sobre o microeletrodo de cobre em diferentes eletrólitos (complexação em soluções tampão e oxidação em meio de NaOH). Pode ser observado que o aumento de

corrente é linear em todas as soluções, entretanto a sensibilidade em tampão fosfato é maior que nas outras soluções e segue a ordem: tampão fosfato > tampão carbonato > solução NaOH > tampão borato. Assim, baseado nestes estudos escolheu-se como melhor meio eletródico o tampão fosfato e desta maneira, os estudos seguintes foram realizados utilizando este eletrólito suporte.

Figura 20. Rotas para determinação de glifosato usando eletrodo de cobre.

Figura 21. Resposta eletroquímica do glifosato sobre microeletrodo de cobre em diferentes eletrólitos suporte.

4.2.1.4 Estudo comparativo do comportamento eletroquímico da glicina, do glifosato e do ácido aminometilfosfônico (AMPA)

As moléculas da glicina, do glifosato e do ácido aminometilfosfônico (AMPA) possuem uma estrutura química muito interessante, como pode ser visto na Figura 22. O aminoácido glicina é precursor na síntese do herbicida glifosato, já o AMPA é o produto de degradação majoritário deste herbicida. Assim, um estudo comparativo do comportamento eletroquímico destas moléculas seria interessante.

Figura 22. Comparação das estruturas químicas das moléculas de glicina, de glifosato e de AMPA.

A Figura 23a-c mostra os voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5) na presença destas substâncias. Comparando os voltamogramas obtidos na presença de glicina e AMPA (linhas cheias) com os voltamogramas obtidos somente em eletrólito de suporte (linha pontilhada), pode ser observado um nítido aumento da corrente na região anódica do perfil voltamétrico, como relatado anteriormente para o glifosato (Figura 23b). Na varredura positiva, ocorre um aumento da corrente anódica na região de formação de óxidos na faixa de -0,15 a 0,7 V, sendo que cada substância apresentou uma maior ou menor interação com o eletrodo de cobre. Para um mesmo valor de concentração, a ordem de interação obtida foi glifosato > glicina > AMPA. A Figura 24 apresenta uma comparação das curvas analíticas obtidas para estas substâncias.

Figura 23. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato na ausência (linha pontilhada) e na presença (linha cheia): (a) de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicina, (b) de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato e (c) de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AMPA. Velocidade de varredura $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Figura 24. Comparação da linearidade das curvas de adição de padrão, obtidas para glicina, glifosato e AMPA.

A Figura 25 mostra os diagramas de distribuição de espécies para glicina, glifosato e AMPA, enquanto a Tabela 4 apresenta os valores das constantes de estabilidade de alguns complexos de Cu(II) formados com estas substâncias. Analisando os diagramas de distribuição de espécies em pH 6,5, valor de pH utilizado neste trabalho, nota-se que para a glicina (Figura 25a) aproximadamente 99,95% de suas espécies estão na forma de HL^- , para o glifosato (Figura 25b) existem duas espécies H_2L^- (13,4%) e HL^{2-} (86,6%) e para o AMPA (Figura 25c) existem 9,1% de H_2L e 90,9% de HL^- . Assim, no valor de pH 6,5, a maioria das espécies para todas as substâncias está na forma HL^x (onde x é uma carga qualquer), deste modo a grande maioria dos complexos de Cu(II) formados teria a forma CuHL^x .

Pela Tabela 4, verifica-se que os valores das constantes de estabilidade dos complexos CuHL^x formados com glicina, glifosato e AMPA são: 10,62; 17,54 e 2,6, respectivamente. Estes valores de constantes mostram que a força do ligante segue

a ordem glifosato > glicina > AMPA. Analisando as estruturas dos três compostos, podemos verificar que enquanto o glifosato apresenta três grupos funcionais capazes de coordenar (grupo amino, carboxilato e fosfonato) a glicina e o AMPA possuem apenas dois (grupos amino e carboxilato e amino e fosfonato, respectivamente), razão que explica o maior poder complexante do glifosato entre estas três substâncias tal como observado nos experimentos de voltametria cíclica.

Tabela 4. Constantes de estabilidade de alguns complexos de Cu(II) formados com glicina, glifosato e AMPA.

Complexos de Cu(II)	Glicina [83]	Glifosato [84]	AMPA [84]
	log K		
CuL^x	8,39	12,71	8,1
CuHL^x	10,62	17,54	2,6
CuL_2^x	16,96	18,15	14,7

L=ligantes totalmente desprotonados, x=carga do complexo (cargas não levadas em consideração)

A oxidação catalítica destes compostos em meio de NaOH, também fornece resultados interessantes. A Figura 26 apresenta os voltamogramas cíclicos da glicina, glifosato e AMPA em meio alcalino. Pode ser observado que para uma mesma concentração, o perfil voltamétrico da oxidação catalítica é diferente para cada composto. De acordo com Luo e colaboradores [72] compostos similares a glicina com modificação no carbono terminal, tal como o AMPA, apresentam uma oxidação semelhante a da glicina, porém com uma intensidade menor, dependendo o grupo substituinte. Entretanto, compostos com substituição no grupo amino, tal com o glifosato, apresentam uma significativa redução da corrente de oxidação, como pode ser observada na Figura 26(b). Desta forma, acredita-se que o grupo amino esteja diretamente envolvido no processo de oxidação e que os grupos substituintes afetam diretamente este processo. Logo, para a oxidação a ordem de interação é glicina > AMPA > glifosato.

Figura 25. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH: (a) glicina, (b) glifosato e (c) AMPA.

(a)

(b)

(c)

Figura 26. Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH na ausência (linha pontilhada) e na presença (linha cheia): (a) de $1,81 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicina, (b) de $1,81 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato e (c) de $1,81 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AMPA. Velocidade de varredura $0,2 \text{ V s}^{-1}$.

4.2.2 Curva de polarização

As curvas de polarização fornecem informações importantes a respeito da corrosão (dissolução) do cobre causada por glifosato, como potencial de corrosão (E_{corr}) e densidade de corrente de corrosão (I_{corr}), inclinação de Tafel (β_a) e densidade de corrente limite (I_{lim}).

A Figura 20 mostra as curvas de polarização obtidas para o microeletrodo de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) em (a) na ausência e (b) na presença de $1,92 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. As duas curvas apresentam duas regiões distintas: uma região de diminuição de corrente até um valor mínimo (I_{corr} e E_{corr}) e uma região de aumento súbito da corrente de corrente até um valor limite (I_{lim}). Pode ser observado que na região catódica entre -0,5 e -0,2 V, não existem diferenças significativas entre as duas curvas de polarização, contudo, a partir de -0,2 V a presença de glifosato na solução tampão deslocou E_{corr} para um valor mais negativo e também aumentou significativamente a I_{lim} , indicando um processo de dissolução anódico. As inclinações de Tafel (β_a) obtidas na ausência e na presença de glifosato estão na faixa de 30 a 70 mV, as quais são características de uma reação de dissolução [85]. Outros parâmetros de corrosão encontrados para a dissolução do microeletrodo estão listados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros de corrosão obtidos para o microeletrodo de cobre.

	β_a (mv dec ⁻¹)	I_{corr} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	E_{corr} (mV)	I_{lim} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)
Sem glifosato	32,1	1,2	-86	53,6
Com glifosato	39,7	2,3	-147	693,3

Figura 27. Curvas de polarização obtidas para o microeletrodo de cobre em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5): (a) na ausência e (b) na presença de 1,92 x 10⁻³ mol L⁻¹ de glifosato.

4.2.3 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma ferramenta poderosa para a investigação de mecanismos de reação, para medir as propriedades dielétricas e de transporte de materiais eletródicos, explorando as propriedades dos eletrodos porosos e investigando suas superfícies [86]. Esta técnica envolve a aplicação de uma perturbação de potencial no sistema sob investigação. A perturbação do potencial é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo sobre o qual é superimposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude. Este método de aplicação de potencial permite que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Existem várias formas de se avaliar a impedância eletroquímica de um sistema, as mais comuns são o gráfico de Bode e o diagrama de Nyquist, contudo este último é o mais

utilizado [87]. Neste tipo de representação, grafica-se o componente imaginário da impedância ($-Z''$) versus o componente real (Z') para cada valor de frequência aplicado. A interpolação dos valores de resistência do gráfico, fornece os valores de resistência da solução não compensada (R_S) entre os eletrodos de trabalho e referência, a resistência de transferência de carga (R_{TC}) e também os valores de capacitância eletroquímica do sistema (C_e).

A Figura 28 apresenta os diagramas de Nyquist obtidos para o microeletrodo de cobre em tampão fosfato na ausência e presença de glifosato e a Tabela 6 fornece os valores experimentais de C_e , R_S e R_{TC} e k_{app} (constante aparente de transferência eletrônica) obtidos para a reação de dissolução do microeletrodo.

Figura 28. Diagramas de Nyquist do microeletrodo de cobre obtidos em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) (a) na ausência e (b) na presença de $1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. Potencial aplicado -20 mV , frequência 100 KHz a 220 Hz .

Tabela 6. Valores experimentais de C , R_S e R_{TC} e k_{app} obtidos para a reação de dissolução do eletrodo de cobre.

	<i>Sem glifosato</i>	<i>Com glifosato</i>
C_e	870 pF	1,6 nF
R_S	3,0 Kohm	2,9 Kohm
R_{TC}	8,2 Mohm	1,3 Mohm
k_{app}	$3,2 \times 10^{-10} \text{ cm s}^{-1}$	$1,9 \times 10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$

Na presença de glifosato, a resistência de transferência de carga (R_{TC}) diminui - quando comparada a solução tampão sem o herbicida – o que indica uma diminuição na R_{TC} da reação de formação da camada de óxidos. O circuito equivalente utilizado para esta reação é bastante simples, circuito de Randles, e está de acordo com o relatado na literatura [88], para a dissolução da camada de óxidos causada pelo glifosato. O circuito é composto de uma R_S em série com um capacitor, sendo que este está em paralelo com a R_{TC} , conforme mostrado abaixo:

Figura 29. Circuito equivalente para o processo de dissolução da camada de óxidos na presença de glifosato.

Conhecendo os valores de R_{TC} pode-se calcular a constante aparente de velocidade eletrônica (k_{app}), utilizando a seguinte fórmula:

$$k_{app} = \frac{RT}{F^2 R_{TC} C}$$

Onde R é a constante dos gases, F é a constante de Faraday, R_{TC} é a resistência de transferência de carga e C é a concentração da solução.

Observa-se que, na presença de glifosato, o valor de k_{app} é quase 6 vezes maior que o encontrado na ausência do herbicida. Com a diminuição da R_{TC} , ocorre um aumento de k_{app} , que por consequência aumenta a velocidade de reação da formação da camada de óxido de cobre, isto é, o glifosato interage com esta camada, dissolvendo-a e deslocando o equilíbrio da reação no sentido da formação da camada de óxidos, tal como discutido na seção 4.2.1.1.

4.2.4 Voltametria hidrodinâmica

A Figura 30 mostra os voltamogramas de varredura linear para o eletrodo rotatório de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) na ausência (linha pontilhada) e na presença de glifosato (linhas cheias). Pode ser observado que, as adições de glifosato na solução tampão aumentam a corrente anódica do eletrodo. Este aumento de corrente está associado à formação do complexo solúvel Cu(II)-glifosato, complexo originado da reação dissolução do óxido de cobre na superfície do eletrodo (Como discutido na seção 4.2.1.1).

Figura 30. Voltamogramas de varredura linear do eletrodo rotatório de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5). Concentração de glifosato: (a) 0; (b) 0,25; (c) 0,5; (d) 0,74; (e) 0,98; (f) 1,22 e (g) $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de rotação 625 rpm, velocidade de varredura 1 mV s^{-1} .

Para determinar o coeficiente de difusão (D) do complexo Cu(II)-glifosato e a constante de velocidade aparente da reação de dissolução foram realizados alguns experimentos de voltametria hidrodinâmica. A Figura 31 mostra o efeito da velocidade de rotação sobre a dissolução anódica do eletrodo de cobre. Até aproximadamente $-0,05 \text{ V}$ a reação é controlada por um processo cinético de transferência de elétrons, mudando para um controle difusional por volta de 0 V . Para uma avaliação quantitativa do processo de dissolução foi utilizada a equação de Koutecký-Levich:

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_k} + \frac{1}{I_d} \quad (1)$$

$$I_k = nFAkC \quad (2)$$

$$I_d = 0,62nFAD^{2/3}\nu^{-1/6}C\omega^{1/2} \quad (3)$$

Onde I_k é a corrente cinética, I_d é a corrente difusional, n é o número de elétrons, F é a constante de Faraday, k é a constante de velocidade aparente, D é o coeficiente de difusão, A é a área do eletrodo, ν é a viscosidade cinemática da solução e ω é a velocidade de rotação.

Figura 31. Influência da velocidade de rotação sobre a dissolução do eletrodo de cobre, na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura 1 mV s^{-1} .

A Figura 32 mostra o gráfico de Koutecký-Levich obtido para a reação de dissolução do cobre. Estes resultados confirmam que a dissolução do óxido de cobre é um processo governado por um processo misto de controle cinético e difusional. A partir do coeficiente linear da Figura 32 obteve-se o termo $1/I_k$ e usando a equação 2 encontrou-se o valor da constante de velocidade aparente (k) da reação igual a $1,2 \times 10^{-2} \text{ cm mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Utilizando o valor da inclinação do gráfico juntamente com a equação 3, encontrou-se um valor de coeficiente de difusão (D) do complexo Cu(II)-glifosato igual a $0,74 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Morillo colaboradores [67] estudaram a reação de complexação entre Cu(II) e glifosato usando voltametria de redissolução

anódica e um eletrodo de gota pendente de mercúrio e obtiveram um valor de coeficiente de difusão (D) do complexo igual a $0,71 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Assim sendo, o valor de D encontrado neste trabalho está de acordo com o valor relatado na literatura [67].

Figura 32. Gráfico de Koutecký-Levich obtido para a reação de dissolução do cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5), na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato.

Para avaliar a potencialidade do eletrodo de cobre como sensor para glifosato foi realizado um experimento amperométrico hidrodinâmico. A corrente amperométrica para a reação de complexação foi registrada a potencial constante igual a $0,05 \text{ V}$, usando o eletrodo rotatório de cobre, com velocidade de 1000 rpm (Figura 33). Pode ser observado nesta figura, que o gráfico de corrente x concentração é linear, indicando que não houve envenenamento da superfície do eletrodo, possibilitando o uso do eletrodo de cobre para a determinação de glifosato.

Figura 33. Amperogramas hidrodinâmicos em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5) mostrando a resposta do eletrodo rotativo de cobre à adição de alíquotas de glifosato. Velocidade de rotação 1000 rpm, potencial aplicado 0,05 V. [Glifosato]: (a) 2,48; (b) 4,95; (c) 7,4; (d) 9,8; (e) 12,2 e (f) 14,5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

4.3 Efeito do herbicida glifosato sobre a dissolução (corrosão) do cobre

A presença de substâncias capazes de formar complexos estáveis com cátions metálicos pode afetar consideravelmente a dissolução e passivação da superfície do cobre. Quando ocorre a formação de um precipitado, é uma evidência de dissolução metálica e subsequente reação com o eletrólito, originando uma nova fase. Isto geralmente confere uma barreira difusional adicional e desta forma, inibe a dissolução geral do metal. Entretanto, se ocorrer a formação de complexos solúveis observa-se um aumento da velocidade de oxidação do metal e conseqüente dissolução metálica [77].

Para avaliar o efeito do glifosato sobre a dissolução do cobre, foram realizados alguns experimentos onde placas de cobre ficaram imersas por 4 dias em solução tampão fosfato, na ausência e na presença de glifosato. Outra placa de cobre foi deixada por 14 dias em uma solução de tampão com glifosato, para avaliar a interação deste herbicida por um período de tempo maior. A dissolução das placas de cobre foi avaliada diariamente para acompanhar a evolução do experimento. A Figura 34 apresenta as micrografias de MEV obtidas para estas placas de cobre e a Figura 35 mostra as análises de EDX.

Em tampão fosfato, na ausência de glifosato, a superfície do cobre foi coberta por um filme de fosfato de cobre, contudo, na presença do herbicida, observou-se o aparecimento gradual de uma coloração azul na solução, indicando a formação de um complexo solúvel entre Cu(II) e glifosato e conseqüente dissolução do cobre. A diferença no processo de dissolução foi evidenciada analisando as concentrações de Cu(II) encontradas na solução após 4 dias e 14 dias de imersão (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração de Cu(II) e comprimento de onda máximo dos complexos formados em solução

	4 dias	14 dias
	[Cu(II)] / ppm	
Tampão	2,82	-----
Tampão + glifosato	360	430

Figura 34. Micrografias de MEV mostrando a superfície do cobre (a) antes e depois da imersão por 4 dias em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) (b) na ausência e (c) na presença de $2,83 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. (d) placa de cobre após 14 dias em solução tampão fosfato na presença de $2,83 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Aumento: 5000x.

Figura 35. Análise de EDX das superfícies do cobre após a imersão por 4 dias em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) (a) na ausência, (b) na presença de $2,83 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato e (c) após 14 dias em tampão fosfato na presença de $2,83 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato.

Quando a placa de cobre ficou imersa na solução de tampão fosfato, o Cu(II) poderia formar um complexo aquoso ou formar um filme de fosfato de cobre sobre a superfície. Conforme mostrado nas figuras anteriores, houve preferencialmente a formação do filme sobre o cobre. Para as placas de cobre imersas por 4 dias em solução tampão na presença de glifosato, além das possibilidades acima, poderia ocorrer a formação do complexo de Cu(II) com o herbicida. Mesmo com a concentração do tampão fosfato sendo 35 vezes maior que a concentração de glifosato, não houve a formação do filme de fosfato de cobre (como observado na análise de EDX), após este período de tempo, mas sim dissolução da placa. Como a quantidade de Cu(II) presente nesta solução é muito maior do que na solução controle, fica evidente que a reação mais favorável foi dissolução da placa de cobre para a formação do complexo com este ligante (produto mais estável). Já no caso da placa de cobre imersa por 14 dias na solução tampão na presença de glifosato, observou-se nos primeiros dias, uma mudança na cor da solução, indicando a formação do complexo solúvel entre Cu(II) e glifosato; passado algum tempo, quando já não havia mais glifosato livre para corroer a placa e formar o complexo, observou-se a formação do filme de fosfato de cobre sobre a superfície da placa, conforme mostrado pela análise de MEV-EDX.

As soluções contendo os complexos foram analisadas por espectrofotometria de UV-vis e apresentaram as mesmas bandas de absorção. A Figura 36 mostra o espectro do complexo formado em solução após os 4 dias de imersão. Os complexos apresentaram duas bandas de absorção com comprimentos de onda muito semelhantes àqueles discutidos na seção 4.1. A primeira banda em 234 nm foi interpretada como uma banda de transferência de carga ligante-metal [5]. A outra banda em 733 nm foi atribuída a transição eletrônica d-d, típica de muitos

complexos de cobre. Comparando estes resultados com os da literatura [5,89] foi proposto que somente uma molécula de glifosato está envolvida na coordenação através da formação no plano equatorial de dois anéis quelatos envolvendo Cu(II) e os grupos amino, carboxilato e fosfonato e com uma molécula de água ocupando a quarta posição no plano e com moléculas de águas de hidratação ocupando as posições axiais.

Figura 36. Espectro de Uv-vis do complexo Cu(II)-glifosato formado em solução após 4 dias.

A fim de obter informações sobre o processo de dissolução sob condição de potencial controlado foram realizados experimentos de eletrólise em tampão fosfato na ausência e na presença de glifosato (Figura 37). A Figura 38 mostra a imagem de MEV-EDX do filme formado sobre o eletrodo e as imagens de MFA do eletrodo de cobre antes e depois da eletrólise na presença de glifosato. Observou-se os mesmos fenômenos descritos anteriormente: na ausência de glifosato, a superfície do eletrodo foi coberta por um filme azul de fosfato de cobre, entretanto, na

presença do herbicida a cor da solução foi gradualmente mudando de transparente para azul, indicando a dissolução do eletrodo de cobre com a formação do complexo solúvel Cu(II)-glifosato. Este complexo apresentou bandas de absorção semelhantes as encontradas no experimento de dissolução das placas de cobre.

Na ausência de glifosato (Figura 37a), inicialmente houve um pequeno aumento de corrente, o qual pode ser associado a uma corrosão por pitting, em seguida ocorreu a diminuição da corrente, sendo que esta diminuição está relacionada a passivação da superfície através da formação do fosfato de cobre. Na presença de glifosato (Figura 37b), o valor de corrente inicial é muito maior que a obtida somente em tampão e observa-se que o valor de corrente diminui com o tempo, devido ao gradiente de concentração produzido em solução, isto é, o consumo de moléculas livres de glifosato, na vizinhança do eletrodo, para a formação do complexo Cu(II)-glifosato.

Figura 37. Cronoamperogramas do eletrodo de cobre em tampão fosfato na ausência (a) e na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. Potencial aplicado = 0,05 V, tempo 7200 s.

Figura 38. (a) Imagem MEV e (b) análise de EDX do filme de fosfato de cobre formado sobre o eletrodo após a eletrólise. Imagens de MFA da superfície do eletrodo de cobre (c) antes e (d) após a eletrólise em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,5) na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glifosato. Potencial aplicado= 0,05 V, tempo 7200 s.

4.3.1 Interação entre glifosato e CuO em pó

Para avaliar a interação entre CuO em pó e glifosato, realizou-se dois experimentos. No primeiro experimento, soluções com várias concentrações de glifosato foram agitadas com CuO, em pH 3,3. No outro experimento, para avaliar a interação do glifosato com CuO em meio tamponante, soluções de 50 mM de tampão fosfato (pH 6,5) com e sem glifosato foram agitadas com CuO. Após um período de agitação as soluções foram filtradas e analisadas. Para ambos os experimentos observou-se a dissolução do CuO na presença do herbicida com a formação do complexo Cu(II)-glifosato. Este complexo apresentou

bandas de absorção com $\lambda_{\text{máx}}$ iguais a 231 nm (banda de transferência de carga ligante-metal) e 736 nm (banda transição d-d), tal como apresentado na seção 4.1.

A Figura 39 mostra o espectro de Uv do complexo Cu(II)-glifosato formado a partir interação entre CuO e diversas soluções de glifosato. Observa-se que com o aumento da concentração de glifosato, mais CuO é dissolvido, resultando o complexo, isto pode é confirmando pelo aumento da intensidade da banda de absorção em 231 nm.

Figura 39. Espectro de Uv do complexo Cu(II)-glifosato formado a partir da interação entre CuO em pó e glifosato: (a) 0, (b) 20, (c) 50, (d) 100, (e) 200 e (f) 300 mg L⁻¹. pH das solução 3,3.

A seguir serão mostrados os resultados dos experimentos realizados em tampão fosfato (pH 6,5) sem e com glifosato. A Figura 40 mostra as soluções filtradas após a agitação com CuO e a Figura 41 apresenta os espectros da região do visível destas soluções. Claramente, existe uma diferença na coloração entre as duas soluções indicando que em meio tamponante, também ocorre a dissolução do CuO e a formação do complexo Cu(II)-glifosato. Outra evidencia da formação deste

complexo foi a concentração de Cu(II) encontradas nas soluções tampão fosfato (ph 6,5): 0,7 ppm na solução sem glifosato e 100 ppm na solução com glifosato.

Figura 40. Foto digitalizada das soluções filtradas após a interação entre CuO e glifosato. (A) solução tampão sem glifosato e (B) solução tampão com 1,7 g L⁻¹ de glifosato.

Figura 41. Espectro da região do visível do complexo formado a partir da interação entre CuO em pó e glifosato. Solução tampão fosfato (pH 6,5) (A) sem e (B) com 1,7 g L⁻¹ de glifosato.

De acordo com a literatura [9], a solubilidade do óxido de cobre em meio aquoso é dependente da concentração de H^+ na solução (de acordo com a equação abaixo) e, quando substâncias complexantes estão presentes, ocorre um consumo de Cu(II) e isto desloca o sentido da reação para o lado dos produtos, levando a uma maior dissolução do óxido de cobre.

O efeito do pH na formação do complexo não é totalmente conhecido, mas os resultados mostraram que a quantidade de Cu(II) aumenta com o aumento da concentração de glifosato, sugerindo algum tipo de reação na superfície entre o glifosato e o CuO. Chang e Matijevic [90] estudaram a interação de agentes complexantes e óxidos metálicos e propuseram dois mecanismos: (1) que os íons metálicos são trocados a partir da superfície e reagem com os agentes complexantes e (2) que o mecanismo de troca está relacionado com as propriedades do óxido, com o pH da solução e com o poder quelante do agente complexante.

4.4 Determinação direta de glifosato em suco de frutas utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada à detecção coulométrica com microeletrodo de cobre

A detecção eletroquímica em sistemas em fluxo, como FIA, cromatografia líquida ou eletroforese capilar, é uma alternativa aos detectores tradicionais (UV, fluorescência e espectrometria de massa). O eletrodo de cobre, como foi discutido, é altamente sensível na determinação de substâncias complexantes, porém, o eletrodo não apresenta uma boa seletividade, ou seja, em uma solução contendo, por exemplo, aminoácidos e glifosato, o eletrodo fornecerá uma somatória das respostas eletroquímicas destes compostos. Desta forma, quando o objetivo é analisar um composto em uma matriz complexa, como alimentos, deve-se separar os interferentes do composto de interesse, utilizando uma coluna cromatográfica adequada.

4.4.1 Desenvolvimento de instrumentação para a determinação direta de glifosato utilizando microeletrodo de cobre

Para a determinação de glifosato foi necessário o desenvolvimento de uma instrumentação para a utilização do microeletrodo. Este projeto foi realizado em conjunto com o laboratório Croma-IQSC e o doutorando Lincoln F. M. Coutinho.

Construiu-se uma célula eletroquímica em acrílico para dois eletrodos, tipo *wall jet* (Figura 5), sendo que um tubo de aço inox foi utilizado como pseudo-referência. O software desenvolvido, denominado ED, foi programado em LabView e foi utilizado tanto para aplicação de potencial quanto para a aquisição do sinal analítico. Este programa é capaz de realizar três modos de detecção

(amperométrico, coulométrico e amperométrico pulsado), voltametria cíclica, pré-tratamento com saltos de potenciais e também aplicar filtros. Para maiores informação sobre a programação do software vide Referência [91]. A Figura 42 apresenta os painéis do programa utilizado neste trabalho.

Figura 42. Painéis frontais do programa utilizado na detecção coulométrica com microeletrodo de cobre. (a) painel mostrando experimento *on-line*, (b) aplicação de filtros e (c) parâmetros experimentais.

4.4.2 Otimização do método de cromatografia de interação hidrofílica

A cromatografia de interação hidrofílica é muito similar à cromatografia de fase-normal: apresenta uma fase estacionária polar e uma fase móvel aquosa-orgânica. De acordo com a literatura [92,93], ocorre uma partição seletiva dos analitos entre a fase móvel parcialmente hidrofóbica e a camada de água na

superfície da fase estacionária. A fase estacionária mais usada é a propil amina, que estará protonada em meio neutro ou ácido. Para compostos que são ânions na fase móvel, como o glifosato, esta coluna oferece a possibilidade de um mecanismo de separação por troca aniônica fraca, além da interação hidrofílica [94].

Para o desenvolvimento de uma metodologia de análise de glifosato utilizando um microeletrodo de cobre, é necessário usar uma fase móvel, que não interfira na detecção eletroquímica. Como discutido na seção 4.2.1.3, o melhor eletrólito para a determinação de glifosato foi o tampão fosfato (pH 6,5 - 7,1). Neste experimento a fase móvel utilizada foi tampão fosfato na concentração de 30 mM, a qual possibilitou tanto uma boa separação quanto a detecção do glifosato.

O efeito de modificadores orgânicos (acetonitrila e metanol) na resposta eletroquímica do microeletrodo de cobre foi estudado usando voltametria cíclica. Nos experimentos em que a acetonitrila foi adicionada ao tampão fosfato, observou-se um perfil voltamétrico diferente daquele obtido na ausência de acetonitrila. Este modificador orgânico é um agente complexante muito forte e interage da mesma forma que o glifosato, dissolvendo a camada de óxidos presente no microeletrodo. No modo de separação por interação hidrofílica, seria necessário usar de 25 a 75% de algum modificador orgânico e se a acetonitrila fosse utilizada, esta poderia corroer muito o microeletrodo de cobre, o que comprometeria o experimento. Entretanto, quando metanol foi utilizado, não se observou nenhuma alteração no perfil voltamétrico do microeletrodo. Desta forma, estudou-se a quantidade de metanol que seria adicionada a fase móvel. Quando 75% de metanol foi utilizado, não houve resposta eletroquímica para a quantidade de glifosato injetada na coluna. Para um valor de 50% de metanol houve uma alta resposta para o glifosato, entretanto, este apresentou um pico com cauda (*tailing peak*), devido a sua forte

adsorção na fase estacionária. Por outro lado, quando uma fase móvel mais polar (25% de metanol) foi utilizada, o glifosato ficou menos retido na coluna e apresentou um pico mais simétrico. Com base nestes resultados utilizou-se uma fase móvel 75:25 (v/v) 30 mM tampão fosfato pH (6,8) : metanol.

4.4.3 Otimização da detecção coulométrica

A aplicação de potencial constante (amperometria dc) em sistemas de fluxo (FIA, eletroforese capilar ou HPLC) utilizando metais não-nobres, como o cobre, para a determinação de compostos alifáticos polares, não causa o envenenamento (*fouling*) da superfície do eletrodo, ao contrário do que ocorre com a utilização de metais nobres, como o ouro, onde se faz necessário a aplicação de pulsos de potenciais como forma de limpeza do eletrodo – tal técnica chama-se detecção amperométrica pulsada (do inglês *Pulsed Amperometric Detection - PAD*).

A detecção em fluxo de substâncias complexantes pode ser realizada com a aplicação de potencial constante (amperometria dc ou coulometria). Aplica-se um potencial no qual ocorre a formação dos óxidos de cobre, deste modo, quando uma substância complexante passa pela superfície do eletrodo, ocorre a interação entre esta molécula e a camada de óxido, dissolvendo-a e assim deslocando o equilíbrio da reação, aumentando a corrente anódica do eletrodo, o que gera o sinal analítico.

Nesta metodologia, após sucessivas injeções de uma solução de glifosato, a sensibilidade do microeletrodo de cobre não foi reduzida. O bom desempenho do sistema de detecção pode ser explicado pelo fato da superfície do eletrodo ser renovada constantemente pela aplicação do potencial. Neste trabalho o potencial do eletrodo foi mantido constante a 0,05 V. Outros potenciais foram testados (0,15 e

0,25 V), entretanto, estes não foram reprodutíveis, após várias injeções de glifosato a resposta eletroquímica do microeletrodo diminuiu gradativamente.

4.4.4 Aplicação da cromatografia de interação hidrofílica com detecção coulométrica

Para avaliar a aplicabilidade desta metodologia em uma matriz complexa, determinou-se glifosato em sucos de frutas. A Figura 43 apresenta um cromatograma de uma solução de 6,8 mg L⁻¹ de glifosato e também a curva analítica obtida na determinação de glifosato. A resposta coulométrica foi linear na faixa de concentração estudada (0,7 a 34 mg L⁻¹) e apresentou um excelente coeficiente de correlação.

A Figura 44 e a Figura 45 apresentam os cromatogramas dos sucos de tomate, maçã e uva fortificados com glifosato. As recuperações de glifosato no suco de tomate, maçã e uva foram 88%, 92% e 90%, respectivamente e não foram encontrados traços deste herbicida nestas amostras. Pode ser observado que o glifosato pode ser detectado sem a interferência de outros agentes complexantes presentes nas frutas, como aminoácidos e os ácidos cítrico, oxálico, málico ou tartárico, que também podem interagir com o óxido de cobre no eletrodo. O limite de detecção encontrado nesta metodologia foi de 100 µg L⁻¹ ($0,59 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), calculado como 3 sinal/ruído (3 S/R). O EPA determina um limite máximo de resíduos (LMR) de glifosato em frutas e vegetais na faixa de 0,2 a 5 mg Kg⁻¹. As Nações Unidas (FAO) estabelece o LMR de 0,1 a 5 mg Kg⁻¹ em frutas e grãos. Na Brasil, a ANVISA estabelece um limite de glifosato de 0,2 mg Kg⁻¹ para frutas. Comparando estes valores de LMR com o limite de detecção encontrado neste trabalho, observa-se que esta metodologia pode ser utilizada para a determinação

deste herbicida em frutas, uma vez que apresenta um limite de detecção igual ou menor que o máximo permitido nestes alimentos.

Figura 43. Cromatograma de uma solução padrão de glifosato ($6,8 \text{ mg L}^{-1}$) e a curva analítica obtida utilizando a detecção coulométrica. Condições: fase móvel 30 mM tampão fosfato pH 6,8 : metanol [75:25 (v/v)], fluxo 1 mL min^{-1} , volume injeção $20 \mu\text{L}$, potencial aplicado 0,05 V.

Figura 44. Cromatograma de suco de tomate fortificado com $13,5 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato. Condições vide Figura 43.

Figura 45. Cromatogramas dos sucos de frutas fortificado com $6,8 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato (a) maçã e (b) uva. Condições vide Figura 43.

4.5 Determinação direta de glifosato e AMPA em água utilizando cromatografia por troca aniônica aliada a detecção coulométrica com eletrodo de cobre

4.5.1 Desenvolvimento de uma célula eletroquímica do tipo *thin-layer*

Apesar do excelente desempenho da instrumentação utilizada da determinação de glifosato utilizando microeletrodo de cobre, a célula eletroquímica em acrílico possui a desvantagem de sua utilização ser limitada exclusivamente à microeletrodos, não permitindo dessa maneira, a utilização de eletrodos convencionais, pelo fato destes requererem um controle potencioestático. Além desse inconveniente, esta célula tinha alguns problemas relacionados à vedação do eletrodo de trabalho. Com o intuito de se contornar tais problemas, foi desenvolvida uma nova célula de detecção, agora para três eletrodos. O corpo da célula foi confeccionado em aço inox 316L, e apresenta as conexões de entrada e de saída da fase móvel e também funciona como eletrodo auxiliar. O eletrodo de cobre foi embutido em teflon e se conecta ao corpo de aço inox através de parafusos. O eletrodo de referência utilizado foi um Ag/AgCl (*lab made*). Para esta célula eletroquímica foram confeccionados 3 espaçadores (estes ficam entre o eletrodo de trabalho e o corpo metálico) com diferentes espessuras: 0,5 mm (teflon), 0,1 e 0,05 mm (folha de acetato). Esta célula é do tipo *thin layer*, ou seja, o fluxo da fase móvel é paralelo à superfície do eletrodo. Não houve problemas de vedação ou vazamentos na célula. A instrumentação utilizada foi a mesma da seção 4.4.1, entretanto, usou-se o potencioestado para aplicação do potencial. A Figura 46 apresenta o painel frontal do programa mostrando um cromatograma *on-line* de uma

mistura de AMPA e glifosato. A Figura 47 apresenta um corte transversal da célula eletroquímica e a Figura 48 mostra a visão explodida da mesma.

Figura 46. Painel frontal do programa mostrando o cromatograma on-line de uma mistura de AMPA ($55,5 \text{ mg L}^{-1}$) e glifosato ($8,4 \text{ mg L}^{-1}$).

Figura 47. Corte transversal da célula eletroquímica.

Figura 48. Visão explodida da cela desenvolvida. (Obs. As partes coloridas em verde possuem rosca).

4.5.2 Otimização do método de cromatografia por troca aniônica

Na cromatografia por troca aniônica a fase estacionária é altamente carregada, sendo que solutos com cargas negativas são seletivamente adsorvidos nesta fase. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentelemente eluídos, por deslocamento com outros íons negativos, porém com maior força de interação com a fase estacionária. A separação de compostos através de cromatografia por troca aniônica está baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel no grupo trocador na fase estacionária. A diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e a fase estacionária é devido à diferença de carga, sendo possível controlá-la utilizando fatores como pH e a força aniônica. Neste modo de separação podem ser utilizadas soluções ácidas, básicas ou ainda tampões, como o fosfato, borato ou acetato. Podem ser adicionados modificadores orgânicos com a finalidade de se aumentar a seletividade para um determinado propósito [95].

Para a determinação de AMPA e glifosato foi utilizada uma solução tampão fosfato como fase móvel, e não foi necessário adicionar qualquer modificador orgânico. A Figura 49 apresenta os gráficos de superfície para o AMPA e glifosato, onde é mostrada a relação entre a concentração do tampão fosfato, tempo de retenção e o pH da solução. Pode ser observado que, para ambos, o tempo de retenção diminui com o aumento da concentração do tampão, isto é, quanto maior a força iônica do meio mais rapidamente estes compostos serão eluídos; observa-se também que o pH da solução também influencia nos tempos de retenção, uma vez que, aumentando o valor de pH da fase móvel, aumenta o número de espécies de fosfato com duas cargas negativas, contribuindo assim, para uma rápida eluição destes compostos.

Figura 49. Gráficos de superfície mostrando a relação entre tempo de retenção, concentração do tampão e pH da solução. [AMPA]=55,5 mg L⁻¹ e [glifosato]=8,4 mg L⁻¹, fluxo 1 mL min⁻¹, volume de injeção 20 µL, potencial aplicado = 0,3 V.

4.5.3 Otimização da detecção coulométrica

A fim verificar o melhor potencial para a determinação de glifosato e AMPA foram estudados vários potenciais entre 0 e 0,5 V (Figura 50). Para este estudo foram injetadas alíquotas de uma solução padrão de glifosato, no modo FIA, sem coluna. Observa-se que a resposta eletroquímica aumenta até um máximo em 0,3 V e depois diminui, desta forma, este potencial foi escolhido como ideal para os experimentos.

Antes do início dos experimentos, o eletrodo de cobre foi polido e lavado com ácido nítrico diluído e água. A cada nova injeção, realizou-se um pré-tratamento eletroquímico no eletrodo de cobre, onde se aplicou -0,3 V por 100s e 0,3 V por 100s. Este procedimento garantiu a reprodutibilidade do método.

Figura 50. Variação da resposta eletroquímica em função do potencial aplicado. Média de 5 injeções de uma solução padrão de glifosato ($8,4 \text{ mg L}^{-1}$). Fase móvel 50 mM de tampão fosfato (pH 6,8), fluxo 1 mL min^{-1} , volume de injeção 20 μL .

Outro parâmetro avaliado foi a espessura do espaçador utilizado na célula eletroquímica. A Figura 51 mostra os cromatogramas de uma mistura de AMPA e glifosato obtidos utilizando diferentes espaçadores. Quando se utilizou o espaçador de 0,5 mm, foi obtido um sinal analítico cerca de 3 vezes menor que o sinal obtido com o espaçador mais fino (0,05 mm). Os espaçadores servem para delimitar o volume morto da célula, ou seja, quanto mais fino for o espaçador menor será o volume morto e menor será a diluição dos compostos eluídos e por consequência o sinal analítico obtido será maior (maior sensibilidade). Os volumes mortos calculados foram 0,75 μL , 1,5 μL e 7,5 μL , para os espaçadores de 0,05, 0,1 e 0,5 mm de espessura, respectivamente.

Figura 51. Cromatogramas de uma mistura de AMPA e glifosato obtidos com espaçadores de diferentes espessuras: (1) 0,5 mm, (2) 0,1 mm e (3) 0,05 mm. Condições: Fase móvel 50 mM de tampão fosfato (pH 6,8), fluxo 1 mL min^{-1} , volume de injeção $20\text{ }\mu\text{L}$, $[\text{AMPA}] = 55,5\text{ mg L}^{-1}$ e $[\text{glifosato}] = 8,4\text{ mg L}^{-1}$.

4.5.4 Aplicação da cromatografia por troca aniônica com detecção coulométrica

Depois de otimizadas as condições de separação (50 mM de tampão fosfato pH 6,8) e de detecção (espaçador de 0,05 mm, potencial = 0,3V, pré-tratamento eletroquímico antes de cada injeção) aplicou-se esta metodologia para determinação direta de AMPA e glifosato em amostras de água.

A repetibilidade do método nas condições analíticas otimizadas, em termos de áreas dos picos cromatográficos, foi testada pela injeção de uma mistura de AMPA (55,5 mg L⁻¹) e glifosato (8,4 mg L⁻¹) em 5 repetições sucessivas. Os dados estatísticos estão na Tabela 8. Pode ser observado que para ambos os compostos existe uma boa repetibilidade.

Tabela 8. Dados estatísticos encontrados para 5 injeções sucessivas de uma mistura de AMPA e glifosato – repetibilidade da área do pico cromatográfico.

Repetição	Área do pico (μC s ⁻¹)	
	AMPA	Glifosato
1	1,74	3,33
2	1,77	3,55
3	1,78	3,62
4	1,82	3,60
5	1,80	3,25
Média	1,78 (±0,03)	3,47 (±0,16)

A Figura 52 mostra as curvas analíticas obtidas para o AMPA e para o glifosato utilizando detecção coulométrica com eletrodo de cobre. A resposta analítica foi linear no intervalo de concentração testado (6,9 a 111 mg L⁻¹ para a AMPA e 1 a 16,9 mg L⁻¹ para o glifosato) e apresentou excelente coeficiente de correlação. O limite de detecção encontrado para o AMPA e para o glifosato foi 240 μg L⁻¹ e 38 μg L⁻¹, respectivamente, calculados como 3 sinal/ruído (3S/R).

Figura 52. Curvas analíticas obtidas para o AMPA e glifosato utilizando a detecção coulométrica com eletrodo de cobre. Fase móvel 50 mM de tampão fosfato (pH 6,8), fluxo 1 mL min⁻¹, volume de injeção 20 µL.

Não foram encontrados traços de glifosato e AMPA nas amostras de água mineral ou água potável. A Figura 53 apresenta um cromatograma de uma amostra de água mineral fortificada com 6,9 mg L⁻¹ de AMPA e 8,5 mg L⁻¹ de glifosato. Pode observado que não existem possíveis interferentes, o que possibilita a análise rápida

destes compostos (menos de 7 minutos), e sem a necessidade de extração ou limpeza da amostra.

Figura 53. Cromatograma de uma amostra de água mineral fortificada com $6,9 \text{ mg L}^{-1}$ de AMPA e $8,5 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato. Condições vide Figura 52.

Uma maneira muito utilizada para melhorar o limite de detecção de um método é usar técnicas de pré-concentração da amostra, que podem ser por rotoevaporação ou utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE). O limite de detecção encontrado para o glifosato ($38 \mu\text{g L}^{-1}$) é bastante satisfatório para a análise deste herbicida em águas, entretanto, a fim de melhorar o limite de detecção, estudou-se a pré-concentração de amostras de água, por meio de cartuchos de SPE, contendo fase estacionária de troca aniônica forte – SAX.

A Figura 54 apresenta os cromatogramas de água potável fortificada com glifosato antes e depois da pré-concentração. O cromatograma na Figura 54(c) mostra o pico do glifosato ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) antes da pré-concentração. Após a pré-concentração da amostra (20 vezes) (Figura 54(b)), obteve-se uma recuperação de

83,0%. O novo limite de detecção para o glifosato, levando-se em consideração a pré-concentração, é agora de $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$. Este estudo de pré-concentração com cartuchos de SPE foi realizado com o intuito de demonstrar que é possível diminuir o limite de detecção obtido neste método. Para que a recuperação de glifosato esteja na faixa de 90 a 100% seria necessário um estudo mais detalhado, onde todas as variáveis fossem otimizadas (pH da amostra, tipo de extrator, pH e concentração do extrator, etc). Assim, propõe-se que em trabalhos futuros esta otimização seja realizada para melhorar o método desenvolvido.

A ANVISA estabelece um limite máximo de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato em água, e segundo o CONAMA, o valor máximo permitido é de $65 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas classe 1 ou 2 e de $180 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas classe 3. Desta forma, a metodologia desenvolvida neste trabalho forneceu limite de detecção adequado para a análise de glifosato, que atende a legislação brasileira: $38 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$ (com pré-concentração).

Figura 54. Cromatogramas de uma amostra de água potável fortificadas com glifosato. (a) $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato antes da pré-concentração, (b) após a pré-concentração e (c) padrão de glifosato.

4.6 Desenvolvimento e validação de um método de análise de glifosato em soja utilizando cromatografia de interação hidrofílica aliada a detecção coulométrica com eletrodo de cobre.

4.6.1 Otimização do método de cromatografia de interação hidrofílica

Para a determinação de glifosato em soja, foi utilizada uma coluna amino diferente da utilizada na seção 4.4. A nova coluna apresenta 100% de estabilidade em soluções aquosas, ou seja, não foi necessário utilizar solventes orgânicos na fase móvel. Desta forma, a fase móvel consistiu apenas de tampão fosfato, na concentração de 60 mM (pH 6,6).

4.6.2 Otimização da detecção coulométrica

Para este experimento, foi construído um mini-potenciostato, o qual foi acoplado a célula eletroquímica descrita na seção 4.5.1. O potenciostato foi avaliado e teve seu desempenho comparado com um potenciostato comercial, por meio de experimentos de voltametria cíclica.

Para verificar o melhor potencial para a determinação de glifosato foram estudados vários potenciais entre 0,1 e 0,5 V (Figura 55). Para este estudo foram injetadas alíquotas de uma solução padrão de glifosato. Observa-se que a área do pico cromatográfico aumenta até um máximo em 0,4 V, desta forma, este potencial foi escolhido como ideal para os experimentos. Neste experimento, utilizou-se o espaçador de 0,05 mm de espessura (0,75 μ L de volume morto).

Antes do início dos experimentos, o eletrodo de cobre foi polido e lavado com ácido nítrico diluído e água. Antes de cada injeção, realizou-se um pré-

tratamento eletroquímico no eletrodo de cobre, onde se aplicou -0,5 V por 100s e 0,4 V por 100s. Este procedimento garantiu a reprodutibilidade do método.

Figura 55. Variação da área do pico cromatográfico em função do potencial aplicado. Média de 3 injeções de uma solução padrão de glifosato. Fase móvel 60 mM de tampão fosfato (pH 6,6), fluxo 1 mL min⁻¹, volume de injeção 20 μL .

4.6.3 Aplicação da cromatografia de interação hidrofílica com detecção coulométrica

Depois de escolhidas as melhores condições de separação (60 mM de tampão fosfato pH 6,6) e de detecção (espaçador de 0,05 mm, potencial = 0,4V, pré-tratamento eletroquímico antes de cada injeção) aplicou-se esta metodologia para a determinação de glifosato em soja.

A Figura 56 mostra um cromatograma de uma solução padrão de glifosato (25 mg L⁻¹) e a curva analítica obtida utilizando a detecção coulométrica com eletrodo de cobre. A curva foi linear na faixa de concentração estudada (0,5 a 25 mg L⁻¹) e apresentou boa linearidade. O limite de detecção encontrado para o glifosato

foi $53,4 \mu\text{g L}^{-1}$, calculado como 3 S/R. Este valor é satisfatório para a determinação de glifosato em soja, uma vez que o LMR para este cereal, segundo a ANVISA, é de 10 mg Kg^{-1} .

Figura 56. Cromatograma de uma solução padrão de glifosato (25 mg L^{-1}) e a curva analítica obtida utilizando a detecção coulométrica. Condições: fase móvel 60 mM tampão fosfato (pH 6,6), fluxo 1 mL min^{-1} , volume injeção $20 \mu\text{L}$, potencial aplicado $0,4 \text{ V}$.

A soja obtida no comércio local não apresentou traços de glifosato. A Figura 57 apresenta um cromatograma de uma amostra de soja fortificada com 50 mg Kg^{-1} de glifosato. Tal como nos sucos de frutas, existe um composto desconhecido contido no extrato da soja, que apresenta um pico cromatográfico com área superior aos demais compostos e com um grande tempo de retenção. Sem a presença deste composto a análise de glifosato poderia ser realizada em um tempo menor, tornando o método mais rápido e econômico. Para eliminar a interferência deste composto, foram utilizadas duas fases móveis: 1ª fase móvel = 60 mM de tampão fosfato (pH 6,6) para a separação e 2ª fase móvel = 0,12 M de tampão fosfato (pH 6,5) para a

rápida eluição do composto interferente. Inicia-se a corrida cromatográfica com 1ª fase móvel e após 5 minutos troca-se para a 2ª fase móvel com maior força iônica (acelerando a eluição do composto), onde permanece por 10 minutos e em seguida é substituída novamente para a 1ª fase móvel por 20 minutos para o reequilíbrio do sistema. Registrou-se somente os 10 minutos iniciais, que são necessários para a separação do glifosato, e após este tempo desliga-se a célula eletroquímica, garantindo que não haja desgaste do eletrodo de cobre, durante as trocas dos eluentes. A utilização de duas fases móveis diminuiu o tempo de análise de 55 minutos para 35 minutos, tornando a determinação de glifosato em soja mais rápida. Os cromatogramas das amostras de soja fortificadas com glifosato, obtidas com este procedimento, são mostradas na Figura 58.

Figura 57. Cromatograma de uma amostra de soja fortificada com 50 mg Kg⁻¹ de glifosato. Condições cromatográficas vide Figura 56.

Figura 58. Cromatograma de uma amostra de soja fortificada com 10 mg Kg^{-1} e 15 mg Kg^{-1} de glifosato. Condições cromatográficas vide Figura 56.

Para averiguar a exatidão e precisão do método de análise de glifosato em soja foram realizados ensaios de recuperação com 9 determinações, sendo estas com 3 níveis de fortificação com 3 réplicas. Novamente, não foi necessária qualquer etapa de extração ou limpeza da amostra e o glifosato pode ser detectado sem a interferência de outros compostos. Os resultados obtidos estão na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados dos ensaios de recuperação de glifosato em soja

Fortificação (mg Kg ⁻¹)	Recuperação (mg Kg ⁻¹)	Recuperação (%)	Desvio padrão	CV (%)
10	10,17	101,7	9,06	9,7
	9,32	93,2		
	8,36	83,6		
15	12,43	82,9	0,64	0,7
	12,28	81,9		
	12,46	83,1		
50	47,40	94,8	2,12	2,2
	49,20	98,4		
	47,50	95,0		

Os resultados obtidos são considerados excelentes, uma vez que as recuperações obtidas (81,9 a 101,7%) estão compreendidas na faixa de 70 a 120%, a qual é recomendada para a análise de pesticidas em alimentos [96,97]. O nível de fortificação de 10 mg Kg⁻¹ apresentou o maior coeficiente de variação (CV=9,7%), entretanto, este valor não ultrapassou o valor estabelecido de 20%, valor aceitável para a análise de pesticidas, indicando desta forma que o método é preciso.

Para avaliar a exatidão calculou-se a média dos três níveis de fortificação e aplicou-se o Teste t de Student [96]. Os valores obtidos estão na Tabela 10.

O valor de t experimental foi calculado, através da equação a seguir, e encontrou-se um valor igual a 2,35. O valor de t tabelado é 4,3 com 95% de confiança e $n-1$ graus de liberdade. Como o valor $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab}}$, não se pode afirmar que

existem diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%), mostrando assim que o método é exato.

$$t_{\text{exp}} = \frac{(X_{\text{rec}} - 100\%) \sqrt{n}}{S_{\text{rec}}}$$

Tabela 10. Dados estatísticos relativos aos experimentos de recuperação

Fortificação (mg Kg ⁻¹)	Recuperação média (%)	X _{rec} (%)	Desvio Padrão (S _{rec})	t _{exp}
10	92,8	90,51	6,98	2,35
15	82,68			
50	96,0			

X_{rec}=média das recuperações, S_{rec}= desvio padrão da média e t_{exp}=valor de t calculado.

Outro parâmetro avaliado foi a estabilidade do eletrodo de cobre a longo prazo. Inicialmente o eletrodo de trabalho foi submetido ao tratamento de polimento e limpeza, como descrito na seção 3.2.6.2, e avaliou-se a repetibilidade da área do pico cromatográfico por meio da injeção diária de 10 réplicas de uma solução de 10 mg L⁻¹ de glifosato. Para avaliar a reprodutibilidade, nos dias seguintes, a mesma superfície do eletrodo foi utilizada, ou seja, não houve um polimento do eletrodo antes das injeções. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11. Avaliação da estabilidade do eletrodo de cobre a longo prazo

Tempo	Área do pico (μC s ⁻¹)	CV (%)	% da área do pico inicial
1º dia	9,33 (± 0,12)	1,28	100,0
2º dia	9,47 (± 0,10)	1,06	101,5
3º dia	9,37 (± 0,11)	1,17	100,4
4º dia	9,77 (± 0,13)	1,33	104,7
5º dia	10,02 (± 0,23)	2,29	107,4

Dentro de cada dia, a área do pico cromatográfico apresentou uma boa repetibilidade apresentando um coeficiente de variação entre 1,06 e 2,29 %. A área média do pico cromatográfico, no período de cinco dias, foi de 9,59 ± 0,29 μC s⁻¹ e

apresentou um coeficiente de variação de 3,07 %, mostrando assim que o método também é reprodutivo.

A temperatura da coluna é um fator importante que influencia a retenção de compostos polares na separação por cromatografia por interação hidrofílica. Desta forma, quatro valores de temperatura foram estudados: 30, 35, 40 e 45°C. Para cada aumento de 5°C na temperatura houve um aumento de 1 segundo no tempo de retenção do glifosato, conforme Tabela 12.

Tabela 12. Variação do tempo de retenção do glifosato em função da temperatura da coluna

	30°C	35°C	40°C	45°C
Tempo de Retenção (s)	462	463	464	465

A relação entre o fator de retenção (k) e a temperatura da coluna (T) é descrita pela equação de van't Hoff [98,41]:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi$$

Onde ΔH^0 e ΔS^0 são a entalpia de retenção e entropia, R é a constante dos gases e Φ é a razão fase. O valor de k é calculado de acordo com a fórmula:

$$k = \frac{t_{ret} - t_{vm}}{t_{vm}}$$

Onde t_{ret} é o tempo de retenção do glifosato e t_{vm} é o tempo do volume morto, no caso, 181 s.

Para o glifosato, construiu-se um gráfico de $\ln k \times 1/T$, que está representado na Figura 59. A inclinação da curva fornece um valor de -68,46, que substituído na equação de van't Hoff fornece um valor de entalpia de retenção igual a +0,56 KJ mol⁻¹

¹, ou seja, a transferência de um mol de glifosato da fase móvel para a fase estacionária absorve 0,56 KJ (reação endotérmica). Tal como observado na Tabela 12, quando aumenta a temperatura da coluna, aumenta o tempo de retenção do glifosato.

Nas condições que foram feitos estes experimentos (fase móvel tampão fosfato), observa-se que o tempo de retenção do glifosato variou apenas 3 segundos quando a temperatura aumentou de 30 para 45°C, indicando que o método é robusto.

Figura 59. Gráfico de van't Hoff para o glifosato. Fase móvel: 60 mM de Tampão fosfato (pH 6,6), concentração de glifosato 10 mg L⁻¹, volume de injeção 20 µL, fluxo da fase móvel 1 mL min⁻¹

4.7 Comparação das metodologias de análise glifosato

O desenvolvimento de um método analítico envolve muitos passos, desde a amostragem e o seu tratamento até a detecção dos analitos. Estima-se que 2/3 do tempo total de uma análise deva-se a preparação e pré-tratamento da amostra, sendo que estas etapas de preparação são as maiores fontes de erro em um procedimento analítico [99].

A derivatização da amostra, como discutido na seção 1.1.6, é necessária para a determinação de glifosato por técnicas ópticas de UV ou fluorescência, uma vez que a molécula de glifosato não apresenta grupos químicos, os quais possam ser diretamente detectados. As reações de derivatização podem ser pré ou pós-coluna e envolvem a introdução de grupos químicos cromóforos ou fluorescentes na molécula de glifosato. Para reações pré-coluna a completa derivatização pode levar horas (pernoitar), as condições de derivatização são menos reprodutíveis e o excesso de derivatizante deve ser eliminado para não atrapalhar na detecção, sendo que muitas vezes tais reações geram produtos instáveis. Nas reações pós-coluna são exigidos equipamentos especiais, a separação deve ser otimizada separadamente da detecção e reagente derivatizante e produtos secundários não devem responder no detector.

A pré-concentração é necessária quando a concentração da amostra é muito pequena ou quando a sensibilidade do método é baixa, já a limpeza (*clean-up*) da amostra é necessária para remover os compostos que interferem tanto na detecção quanto na instrumentação (no caso das reações de derivatização, a limpeza da amostra é necessária para eliminar o excesso de reagente derivatizante). Assim, o desenvolvimento de um método para a análise de glifosato que não requer um tedioso e complexo preparo da amostra é muito importante.

Como apresentado neste trabalho, a detecção coulométrica de glifosato não requer qualquer reação de derivatização, etapas de limpeza ou extração da amostra. Tanto para as amostras complexas (suco de frutas e soja) quanto para as amostras de água, foi necessário somente centrifugar e filtrar as amostras, sendo que a pré-concentração, no caso da amostra de água, é optativa uma vez que o limite de detecção obtido para o glifosato (sem pré-concentração) atende a legislação. Além do que, na detecção coulométrica de glifosato o tempo total de análise é muito menor, quando comparados aos métodos ópticos, que envolvem um número maior de etapas de preparação das amostras (reação de derivatização, extração e limpeza da amostra).

Outra vantagem da detecção coulométrica é a instrumentação simples e barata. Utiliza-se um (micro)eletrodo de cobre, amplificador de corrente e um potenciostato, que se for *lab-made*, diminui ainda mais o custo da instrumentação. O custo dos reagentes também é baixo, uma vez que se usa tampão fosfato como fase móvel. A Tabela 13 apresenta um resumo das metodologias de análise de glifosato utilizando detecção coulométrica com (micro)eletrodo de cobre.

A Tabela 14 mostra alguns métodos de análise de glifosato relatados na literatura e suas principais características. Pode ser observado que somente um método (eletroforese capilar com fluorescência indireta) não utiliza qualquer etapa de extração/limpeza, derivatização ou pré-concentração da amostra, enquanto que os outros métodos utilizam ao menos uma destas etapas. Esta metodologia foi aplicada somente na determinação de glifosato em formulações comerciais, uma vez que para amostras de água fortificadas com glifosato ($1,69 \text{ mg L}^{-1}$), o sinal analítico não pode ser separado do sinal da linha de base [52]. Para comparar os limites de detecção destes métodos, é necessário que as condições experimentais, tais como,

volume de injeção e fator de pré-concentração sejam similares entre si. Desta forma, a Tabela 14 também apresenta os limites de detecção corrigidos, ou seja, com condições similares as usadas na determinação de glifosato com (micro)eletrodo de cobre (20 µL de injeção e sem pré-concentração da amostra).

Tabela 13. Comparação das metodologias de análise de glifosato utilizando detecção coulométrica com (micro)eletrodo de cobre

	Suco de frutas	Água	Soja
Modo de separação	Interação hidrofílica	Troca-aniônica	Interação hidrofílica
<i>Faixa de concentração</i>	0,7 a 34 mg L ⁻¹ (4 a 201 µM)	1 a 16,9 mg L ⁻¹ (6 a 100 µM)	0,5 a 25 mg L ⁻¹ (3 a 148 µM)
<i>Equação</i>	y=0,0334x	y= -0,262 + 0,613x	y= -0,176 + 0,719x
<i>R</i>	0,9999	0,9997	0,9998
<i>Limite de detecção</i>	100 µg L ⁻¹ (0,59 µM)	32 µg L ⁻¹ (0,18 µM) (SPE) 1,9 µg L ⁻¹ (0,011 µM)	53 µg L ⁻¹ (0,31 µM)
<i>Limite de Quantificação</i>	330 µg L ⁻¹ (1,95 µM)	129 µg L ⁻¹ (0,76 µM) (SPE) 6,3 µg L ⁻¹ (0,037 µM)	177 µg L ⁻¹ (1,05 µM)
<i>% de recuperação das amostras</i>	88,0 a 92,0%	83,0	81,9 a 101,7
<i>Derivatização</i>	não	não	não
<i>Extração /limpeza</i>	não	não	não

Os métodos que apresentam os menores limites de detecção (em negrito) são aqueles que analisaram glifosato em água, uma matriz menos complexa, sendo que tais metodologias utilizaram derivatização e/ou etapas de extração ou limpeza da amostra. Comparando estes métodos com o apresentado neste trabalho que utiliza cromatografia por troca aniônica aliada a detecção coulométrica, pode-se observar que o limite de detecção encontrado (32 µg L⁻¹) é comparável aos apresentados na literatura, com a vantagem de não ser necessário nenhuma etapa de extração/limpeza ou derivatização da amostra, ressaltando ainda que, este limite

de detecção é aceitável perante a legislação brasileira ($500 \mu\text{g L}^{-1}$ – ANVISA e 65 e $180 \mu\text{g L}^{-1}$ – CONAMA) e que a pré-concentração da amostra pode ser utilizada em casos que a quantidade de glifosato a ser detectada é muito pequena e ou o método requer uma maior sensibilidade.

Para as metodologias que analisaram glifosato em amostras complexas, como suco de frutas [36], observa-se que o limite de detecção obtido (sob as mesmas condições), é igual ao limite apresentado quando utilizado cromatografia de interação hidrofílica aliada a detecção coulométrica com microeletrodo de cobre ($\text{LD}=100 \mu\text{g L}^{-1}$) sendo que o método da literatura utiliza etapas de extração/limpeza, derivatização e pré-concentração da amostra. Para a determinação de glifosato em soja, observa-se que o limite de detecção relatado na literatura [49] é 11 vezes maior que o obtido neste trabalho, demonstrando que a sensibilidade da detecção coulométrica de glifosato em amostras complexas é similar, ou melhor, que a maioria dos métodos presentes na literatura. A metodologia de análise de glifosato em soja utilizando detecção coulométrica foi validada e apresentou ótimos resultados, sendo considerado um método exato e preciso com um limite de detecção adequado para a análise de glifosato ($53 \mu\text{g Kg}^{-1}$) que atende a legislação brasileira - ANVISA (10 mg Kg^{-1}) - e também outros órgãos internacionais como EPA (20 mg Kg^{-1}) e FAO (20 mg Kg^{-1}).

Tabela 14. Comparação das técnicas de análise do herbicida glifosato relatadas na literatura

Técnica	Deteção	Amostra	Extração Limpeza	Derivatização	Pré [C]	Volume de Injeção	LD	LD*	Ref.
Eletroforese	Condutividade	Água	Resina troca aniônica forte	-----	65x	80 psi por 10s	85 µg L ⁻¹	-----	50
	Fluorescência indireta	Herbicidas comerciais	----	-----	----	14 cm por 5s	200 µg L ⁻¹	-----	52
	Quimiluminescência	Soja	acetonitrila	----	----	15cm por 15cm	600 µg Kg ⁻¹	-----	49
	Fluorescência	Água	SPE SAX	NDA	100 x	0,5 psi por 3s	0,27 µg L⁻¹	27 µg L⁻¹	48
	Fluorescência	Água de rio	-----	NBD-F	---	3,45 KPa por 3s	32,2 µg L ⁻¹	----	100
CLAE	Espectrofotometria UV	Suco de frutas	SLM	TsCl	10x	20 µL	10 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹	36
	Fluorescência	Água de chuva	Remoção de Cl⁻ H ₂ O-diclorometano	FMOC-Cl	----	100 µL	0,16 µg L⁻¹	0,8 µg L⁻¹	41
		Plantas	SPE SCX	FMOC-Cl	----	100 µL	300 µg Kg ⁻¹	1500 µg Kg ⁻¹	
		Fruta silvestre	Coluna catiônica e aniônica	OPA-Me	10x	100 µL	50 µg Kg ⁻¹	2500 µg Kg ⁻¹	101
		Água	SPE SAX	Thiofluor-OPA	50 x	20 µL	0,02 µg L⁻¹	1 µg L⁻¹	102
	Condutividade	Água	Extração compostos organicos	-----	50 x	50 µL	42 µg L ⁻¹	5450 µg L ⁻¹	103
	ICP-EM	Água	Remoção de Cl⁻	----	-----	500 µL	0,7 µg L⁻¹	17,5 µg L⁻¹	104
	EM-EM	Barro de esgoto	NaOH	FMOC-Cl	600 x	5 µL	20 µg Kg ⁻¹	3000 µg Kg ⁻¹	105
	Deteção amperométrica pulsada-PAD	Urina	Membrana de ultrafiltração (proteínas)	-----	-----	25 µL	51 µg L ⁻¹	64 µg L ⁻¹	60
	Deteção Coulométrica	Suco de frutas	-----	-----	-----	20 µL	100 µg L⁻¹	-----	Neste trabalho
		Água	-----	-----	20 x	20 µL	1,9 µg L⁻¹	32 µg L⁻¹	
		Soja	-----	-----	-	20 µL	53 µg Kg⁻¹	-----	

LD* corrigido para volume de injeção de 20 µL e sem pré-concentração.

5 Conclusões

No estudo inicial de formação de complexos entre Cu(II) e glifosato em solução aquosa, foi demonstrado que o herbicida forma complexos fortes e estáveis com íons Cu(II), e que esta reação de complexação pode ser utilizada para desenvolver metodologias para a análise de glifosato.

No estudo da interação entre microeletrodo de cobre e o glifosato, verificou-se que este herbicida interage com a camada de óxidos na superfície do eletrodo, levando a um aumento da corrente anódica do microeletrodo, resultando a formação de complexo solúvel entre Cu(II) e glifosato. Estudos complementares foram realizados e dados importantes sobre esta reação de dissolução foram obtidos, como, potencial de corrosão, densidade de corrente de corrosão, inclinação de Tafel (curvas de polarização), valores de resistência de transferência de carga e constante aparente de transferência eletrônica (espectroscopia de impedância eletroquímica), coeficiente de difusão do complexo e constante de velocidade aparente da reação (voltametria hidrodinâmica), além de imagens de MEV-EDX e MFA relativos ao processo de corrosão do cobre.

A instrumentação (software, célula eletroquímica e mini-potenciostato) desenvolvida neste trabalho foi utilizada com sucesso na determinação de glifosato em amostras de alimentos e água. As metodologias de análise de glifosato utilizando detecção coulométrica com (micro)eletrodo de cobre aliada a cromatografia líquida, apresentaram limites de detecção adequados para a análise deste herbicida em diversas matrizes.

A detecção coulométrica com (micro)eletrodo de cobre apresentou algumas vantagens sobre a detecção com métodos ópticos:

- Análise direta e rápida, ou seja, não são necessárias demoradas reações de derivatização da amostra;
- Sem etapas de extração/limpeza da amostra;
- Pré-concentração optativa;
- Baixo custo das análises, quando comparado aos preços dos reagentes de derivatização e
- Instrumentação simples e de baixo custo.

6 Referências Bibliográficas

1. HOLLAND, P. T. Pesticides report 36. Glossary of terms relating to pesticides. **Pure & Applied Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 1167-1193, 1996.
2. GALLI, A.; DE SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.
3. CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 341 p.
4. BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 316 p.
5. DANIELE, P. G.; STEFANO, C.; PRENESTI, E.; SAMMARTANO, S. Copper(II) complexes of N-(phosphonomethyl)glycine in aqueous solution: a thermodynamic and spectrophotometric study. **Talanta**, v. 45, n. 2, p. 425-431, 1997.
6. AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
7. DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso - análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 27-36, 2001.
8. SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. **Weed Science**, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1975.
9. GLASS, R. L. Metal complex formation by glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 1249-1253, 1984.
10. HOAGLAND, R. E.; DUKE, S. O. **Biochemical effects of glyphosate**. Washington: ACS, 1982. 48 p. (ACS Symposium Series, 181).
11. COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; DO AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.
12. KALIANNAN, P.; ALI, M. M. N.; SEETHALAKSHMI, T.; VENUVANALINGAM, P. Electronic structure and conformation of glyphosate: an ab initio MO study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 618, n. 1-2, p. 117-125, 2002.
13. PRATA, Fábio. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível da atrazina**. 2002. 161 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
14. CHEN, Y.; WU, F.; LIN, Y.; DENG, N.; BAZHIN N.; GLEBOV, E. Photodegradation of glyphosate in the ferrioxalate system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, n. 1-2, p. 360-365, 2007.

15. CHEN, S.; LIU, Y. Study on the photocatalytic degradation of glyphosate by TiO_2 photocatalyst. **Chemosphere**, v. 67, n. 5, p. 1010-1017, 2007.
16. HUSTON, P. L.; PIGNATELLO, J. J. Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction. **Water Research**, v. 33, n. 5, p. 1238-1246, 1999.
17. ARAÚJO, Ademir Sérgio Ferreira de. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
18. GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, v. 167, p. 35-120, 2000.
19. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Disponível em: <<http://www.epa.gov/safewater/dwh/c-soc/glyphosa.html>>. Acesso em: 20 out. 2007.
20. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1469_00.htm>. Acesso em: 10 maio 2004.
21. CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama/>>. Acesso em: 19 maio 2006.
22. BARJA, B. C.; HERSZAGE, J.; DOS SANTOS AFONSO, M. Iron(III)–phosphonate complexes. **Polyhedron**, v. 20, n. 15-16, p. 1821-1830, 2001.
23. HOGGARD, P. E.; SUBRAMANIAM, V. Metal complexes of glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n.6, p. 1326-1329, 1988.
24. MORILLO, E.; UNDA BEYTIA, T.; MAQUEDA, C.; RAMOS, A. Glyphosate adsorption on soils of different characteristics.: Influence of copper addition. **Chemosphere**, v. 40, n. 1, p. 103-107, 2000.
25. MORILLO, E.; UNDA BEYTIA, T.; MAQUEDA, C. Adsorption of Glyphosate on the Clay Mineral Montmorillonite: Effect of Cu(II) in Solution and Adsorbed on the Mineral. **Environmental Science Technology**, v. 31, n.12, p. 3588-3592, 1997.
26. MORILLO, E.; UNDA BEYTIA, T.; MAQUEDA, C.; RAMOS, A. The effect of dissolved glyphosate upon the sorption of copper by three selected soils. **Chemosphere**, v. 47, n. 7, p. 747-752, 2002.
27. COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão, **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 2005.
28. HEINEKE, D.; FRANKLLIN, S. J.; RAYMOND, K. N. Coordination Chemistry of Glyphosate: Structural and Spectroscopic Characterization of Bis(glyphosate)metal(III) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 11, p. 2413-2421, 1994.
29. PTASZYNSKI, B.; KOBYLECKA, J.; ZWOLINSKA, A. Synthesis and Properties of Complexes of Lead(II), Cadmium(II), and Zinc(II) with N-Phosphonomethylglycine. **Monatshefte für Chemie**, v. 131, n.1, p. 1-11, 2000.
30. RAMSTEDT, M.; NORGREN, C.; SHEALS, J.; BOSTRÖM, D.; SJÖBERG, S.; PERSSON, P. Thermodynamic and spectroscopic studies of cadmium(II)–N-

(phosphonomethyl)glycine (PMG) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, n. 4, p. 1185-1192, 2004.

31. SAGATYS, D. S.; DAHLGREN, C.; SMITH, G.; BOTT, R. C.; WILLIS, A. C. Metal Complexes with *N*-(Phosphonomethyl)glycine (Glyphosate): the Preparation and Characterization of the Group 2 Metal Complexes with Glyphosate and the Crystal Structure of Barium Glyphosate Dihydrate. **Australian Journal of Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 77-81, 2000.

32. PRENESTI, E.; GULMINI, M. Nickel(II) complexes of *N*-(phosphonomethyl)glycine in aqueous solution. **Annali di Chimica**, v. 88, p. 591-595, 1988.

33. SAGATYS, D. S.; DAHLGREN, C.; SMITH, G.; BOTT, R. C.; WHITE, L. C. The complex chemistry of *N*-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate): preparation and characterization of the ammonium, lithium, sodium (4 polymorphs) and silver(I) complexes. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, v. 19, p. 3404-3410, 2000.

34. PTASZYNSKI, B.; ZWOLINSKA, A. Synthesis and properties of solid complexes of lanthanum, cerium, neodymium and erbium with *N*-phosphonomethylglycine. **Polish Journal of environmental Studies**, v. 10, n. 4, p. 257-262, 2001.

35. AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 420-428, 2002.

36. KHROLENKO, M. V.; WIECZOREK, P. P. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with *p*-toluenesulphonyl chloride. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, n. 1-2, p. 111-117, 2005.

37. GAVLICK, W. K.; TOMKINS, D. F. An Updated Liquid Chromatographic Assay for the Determination of Glyphosate in Technical Material and Formulations. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 91, n. 1, p. 1-4, 2008.

38. MOROVJÁN, G.; FEKETE, J.; RÉPÁSI, J. Determination of Glyphosate and Some Related Compounds by Ion-Exchange High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 18, n. 16, p. 3219-3232, 1995.

39. POWELL, H. A.; KERBY, N. W.; ROWELL, P. High-performance liquid chromatographic determination of the herbicide glyphosate and its metabolite (aminomethyl)phosphonic acid and their extraction from cyanobacteria. **Journal of Chromatography A**, v. 502, p. 201-207, 1990.

40. HIDALGO, C.; RIOS, C.; HIDALGO, M.; SALVADO, V.; SANCHO, J.; HERNANDEZ, F. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. **Journal of Chromatography, A**, v. 1035, p. 153-157, 2004.

41. NEDELKOSKA, T. V.; LOW, G. K-C. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column

derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, n. 1, p. 145-153, 2004.

42. SANCHEZ, J. V.; HIDALGO, C.; HERNANDEZ, F. LOPEZ, F. J.; HOGENDOORN, E. A.; DIJKMAN, E. Rapid Determination of Glyphosate Residues and Its Main Metabolite Ampa in Soil Samples by Liquid Chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 53-63, 1996.

43. ABDULLAH, M. P.; DAUD, J.; HONG, K. S.; YEW, C. H. Improved method for the determination of glyphosate in water. **Journal of Chromatography A**, v. 697, n. 1-2, p. 363-369, 1995.

44. COWELL, J. E.; KUNSTMAN, J. L.; NORD, P. L.; STEINMETZ, J. R.; WILSON, G. R. Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosphate and metabolite: an interlaboratory study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 955-960, 1986.

45. BAUER, K. H.; KNEPPER, T. P. Analysis of polar organic micropollutants in water with ion chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 837, n. 1-2, p. 117-128, 1999.

46. BÖRJESSON, E.; TORSTENSSON, L. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. **Journal of Chromatography A**, v. 886, n. 1-2, p. 207-216, 2000.

47. IBÁÑEZ, M.; POZO, O. J.; SANCHEZ, J. V.; LÓPEZ, F. J.; HERNÁNDEZ, F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, n. 2, p. 145-155, 2005.

48. JIANG, J.; LUCY, C. A. Determination of glyphosate using off-line ion exchange preconcentration and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection. **Talanta**, v. 72, n. 1, p. 113-118, 2007.

49. CHIU, H-Y.; LIN, Z-Y.; TU, H-L.; WHANG, C-W. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, n. 1, p. 195-198, 2008.

50. CORBERA, M.; HIDALGO, M.; SALVADO, V.; WIECZOREK, P. P. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in natural water using the capillary electrophoresis combined with enrichment step. **Analytica Chimica Acta**, v. 540, n. 1, p. 3-7, 2005.

51. GOODWIN, L.; STARTIN, J. R.; KEELY, B. J.; GOODALL, D. M. Analysis of glyphosate and glufosinate by capillary electrophoresis–mass spectrometry utilising a sheathless microelectrospray interface. **Journal of Chromatography A**, v. 1004, n. 1-2, p. 107-119, 2003.

52. CHANG, S. Y.; LIAO, C-H. Analysis of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with indirect fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 959, n. 1-2, p. 309-315, 2002.

53. GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M. A.; BRUN, E. M.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A.; RAMSEY, K.; RUBIO, F. Glyphosate Immunosensor. Application for Water and Soil Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 13, p. 4219-4227, 2005.

54. RUBIO, F.; VELDHUIS, L. J.; CLEGG, B. S.; FLEEKER, J. R.; HALL, L. C. Comparison of a Direct ELISA and an HPLC Method for Glyphosate Determinations in Water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 691-696, 2003.
55. LEE, E. A.; ZIMMERMAN, L. R.; BHULLAR, B. S.; THURMAN, E. M. Linker-Assisted Immunoassay and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Analysis of Glyphosate. **Analytical Chemistry**, v.74, n. 19, p. 4937-4943, 2002.
56. CLEGG, B. S.; STEPHENSON, G. R.; HALL, J. C. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 5031-5037, 1999.
57. FRIESTAD, H. O.; BROENSTAD, J. O. Improved polarographic method for determination of glyphosate herbicide in crops, soil and water. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 76-79, 1985.
58. FRIESTAD, H. O.; BROENSTAD, J. O. Method for determination of glyphosate residues in natural waters based on polarography of the N-nitroso derivative. **Analyst**, v. 101, p. 820-824, 1976.
59. TEÓFILO, R. F.; REIS, E. L.; REIS, C.; SILVA, G., A.; KUBOTA, L. T. Experimental design employed to square wave voltammetry response optimization for the glyphosate determination. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 865-871, 2004.
60. SATO, K.; JIN, J. Y.; TAKEUCHI, T.; MIWA, T.; SUENAMI, K.; TAKEKOSHI, Y.; KANNO, S. Integrated pulsed amperometric detection of glufosinate, bialaphos and glyphosate at gold electrode in anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 919, n. 2, p. 313-320, 2001.
61. PROGRAMA livre para simulação e análise de curvas de titulação potenciométricas, cálculos de pH e equilíbrio ácido-base (CURTIPO). Disponível em: <<http://www2.iq.usp.br/docente/gutz/Curtipot.html>>. Acesso em: 13 dez. de 2007.
62. PICÓ, Y.; RODRIGUEZ, R.; MAÑES, J. Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 133-151, 2003.
63. STALIKAS, C. D.; KONIDARI, C. N. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 907, n. 1-2. p. 1-19, 2001.
64. DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.
65. DE SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. P.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790-797, 2004.
66. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5. ed. Orlando: Saunders College Publishing, 1998. 570-579 p.

67. MORILLO, E.; MAQUEDA, C.; BEJARANO, M.; MADRID, L.; UNDABEYTIA, T. Cu(II)-glyphosate system: a study by anodic stripping voltammetry and the influence on Cu adsorption by montmorillonite. **Chemosphere**, v. 28, n. 12, p. 2185-2196, 1994.
68. STULIK, K.; PACAKOVA, V.; LE, K.; HENNISSEN, B. Amperometric flow detection with a copper working electrode—response mechanism and application to various compounds. **Talanta**, v. 35, n. 6, p. 455-460, 1988.
69. CHEN, Z.; ALEXANDER, P. W. Potentiometric detection of aliphatic amines by flow injection analysis and ion-interaction chromatography with a metallic copper electrode. **Journal of Chromatography A**, v. 758, n. 2, p. 227-233, 1997.
70. YE, J.; BALDWIN, R. P. Determination of carbohydrates, sugar acids and alditols by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode. **Journal of Chromatography A**, v. 687, n. 1, p. 141-148, 1994.
71. KANO, K.; TAKAGI, K.; INOUE, K.; IKEDA, T.; UEDA, T. Copper electrodes for stable subpicomole detection of carbohydrates in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 721, n. 1, p. 53-57, 1996.
72. LUO, P.; ZHANG, F.; BALDWIN, R. P. Constant-potential amperometric detection of underivatized amino acids and peptides at a copper electrode. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 17, p. 1702-1707, 1991.
73. KOK, W. TH.; HANEKAMP, H. B.; BOS, P.; FREI, R. W. Amperometric detection of amino acids with a passivated copper electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 142, p. 31-45, 1982.
74. KOK, W. TH.; BRINKMAN, U. A. TH.; FREI, R. W. Amperometric detection of amino acids in high-performance liquid chromatography with a copper electrode. **Journal of Chromatography A**, v. 256, p. 17-26, 1983.
75. STULIK, K.; PACAKOVA, V.; JOKUSZIES, G. Analysis of dipeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography without derivatization using amperometric detection on a copper electrode. **Journal of Chromatography A**, v. 463, p. 334-337, 1988.
76. STULIK, K.; PACAKOVA, V.; WEINGART, M.; PODOLAK, M. Operation parameters of voltammetric high-performance liquid chromatographic detectors with copper electrodes and application to a determination of some fodder biofactors. **Journal of Chromatography A**, v. 367, p. 311-321, 1986.
77. CASCALHEIRA, A. C.; ABRANTES, L. M. The electrochemical behaviour of copper in sodium salicylate aqueous solutions. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 27, p. 5023-5028, 2004.
78. COUTINHO, C. F. B.; SILVA, M. O.; CALEGARO, M. L.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H. Investigation of copper dissolution in the presence of glyphosate using hydrodynamic voltammetry and chronoamperometry. **Solid State Ionics**, v. 178, n. 1-2, p. 161-164, 2007.
79. COUTINHO, C. F. B.; SILVA, M. O.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H. Influence of glyphosate on the copper dissolution in phosphate buffer. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 6, p. 3270-3275, 2007.

80. STREHBLOW, H. H.; TITZE, B. The investigation of the passive behaviour of copper in weakly acid and alkaline solutions and the examination of the passive film. **Electrochimica Acta**, v. 25, n. 6, p. 839-850, 1980.
81. LORIMER, J. P.; MASON, T. J.; PLATTES, M.; WALTON, D.J. Passivation phenomena during sonovoltammetric studies on copper in strongly alkaline solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 568, p. 379-390, 2004.
82. LUO, P.; PRABHU, S. V.; BALDWIN, R. P. Constant potential amperometric detection at a copper-based electrode: electrode formation and operation. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 752-755, 1990.
83. FESTA, M. R.; JASIONOWSKA, R. Copper(II) complexes with aspartate and glutamate. **Polyhedron**, v. 8, n. 8, p. 1019-1027, 1989.
84. FREUZE, I.; JADAS-HECART, A.; ROYER, A.; COMMUNAL, P. Y. Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1175, n. 2, p. 197-206, 2007.
85. JONES, D. A. **Principles and prevention of Corrosion**. 2. ed. New York: Macmillan, 1992. 135 p.
86. MACDONALD, D. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 8-9, p. 1376-1388, 2006.
87. DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L.T. Aplicações de QMC, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.
88. SIERRA, E. V.; MÉNDEZ, M. A.; SARRIA, V. M.; CORTÉS, M. T.; Electrooxidación de glifosato sobre electrodos de níquel y cobre. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 220-226, 2008.
89. SHEALS, J.; PERSSON, P.; HEDMAN, B. IR and EXAFS Spectroscopic Studies of Glyphosate Protonation and Copper(II) Complexes of Glyphosate in Aqueous Solution. **Inorganic Chemistry**, v. 40, n. 17, p. 4302-4309, 2001.
90. CHANG, H. C.; MATIJEVIC, E. Interactions of metal hydrous oxides with chelating agents : IV. Dissolution of hematite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 92, n. 2, p.479-488, 1983.
91. COUTINHO, C. F. B.; COUTINHO, L. F. M.; LANÇAS, F. M.; CAMARA, C. A. P.; NIXDORF, S. L. Development of instrumentation for amperometric and coulometric detection using ultramicroelectrodes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 1, p-131-139, 2008.
92. ALPERT, A. J.; SHUKLA, M.; SHUKLA, A. K.; ZIESKE, L. R.; YUEN, S. W.; FERGUSON, M. A. J.; MEHLERT, A.; PAULY, M.; ORLANDO, R. Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 676, n. 1, p. 191-202, 1994.
93. OLSEN, B. A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 1-2, p.113-122, 2001.

94. PERSON, M.; HAZOTTE, A.; ELFAKIR, C.; LAFOSSE, M. Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry assay for taurine and methionine in matrices rich in carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, n. 2, p. 174-181, 2005.
95. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997. 73-93 p.
96. BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.
97. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2006.
98. GUO, Y.; GAIKI, S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, n. 1-2, p. 71-80, 2005.
99. STALIKAS, C. D.; KONIDARI, C. N. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 907, n. 1-2, p. 1-19, 2001.
100. ZHOU, L.; LUO, Z.; WANG, S.; HUI, Y.; HU, Z.; CHEN, X. In-capillary derivatization and laser-induced fluorescence detection for the analysis of organophosphorus pesticides by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, n. 2, p. 377-384, 2007.
101. ARCHER, T. E.; STOKES, J. D. Residue analysis of glyphosate in blackberries by high performance liquid chromatography and postcolumn reaction detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 3, p. 586-588, 1984.
102. 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. **Journal of Chromatography A**, v. 932, n. 1-2, p. 83-90, 2001.
103. ZHU, Y.; ZHANG, F.; TONG, C.; LIU, W. Determination of glyphosate by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 850, n. 1-2, p. 297-301, 1999.
104. GUO, Z.-X.; CAI, Q.; YANG, Z. Determination of glyphosate and phosphate in water by ion chromatography—inductively coupled plasma mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, n. 2, p. 160-167, 2005.
105. GHANEM, A.; BADOS, P.; KERHOAS, L.; DUBROCA, J.; EINHORN, J. Glyphosate and AMPA Analysis in Sewage Sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOc Derivatization on Strong Anion-Exchange Resin as Solid Support. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 10, p. 3794-3801, 2007.

7 Produção Científica

7.1 Artigos publicados relacionados à Tese

1. COUTINHO, Cláudia F. B.; Coutinho, L. F. M.; NIXDORF, S. L.; Camara, C. A. P.; MAZO, Luiz Henrique; LANCAS, F. M.. **Development of instrumentation for amperometric and coulometric detection using ultramicroelectrodes.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, p. 131-139, 2008.
2. COUTINHO, Cláudia F. B.; SILVA, M. O.; MACHADO, Sergio A S.; MAZO, Luiz Henrique. **Influence of glyphosate on the copper dissolution in phosphate buffer.** *Applied Surface Science*, v. 253, p. 3270-3275, 2007.
3. COUTINHO, Cláudia F. B.; SILVA, M. O.; CALEGARO, M. L.; MACHADO, Sergio A S.; MAZO, Luiz Henrique. **Investigation of copper dissolution in the presence of glyphosate using hydrodynamic voltammetry and chronoamperometry.** *Solid State Ionics*, v. 178, p. 161-164, 2007.
4. COUTINHO, Cláudia F. B.; MAZO, Luiz Henrique. **Estudo voltamétrico e espectrofotométrico do complexo Cu(II)-glifosato.** *Pesticidas (UFPR)*, v. 17, p. 123-129, 2007.
5. COUTINHO, Cláudia F. B.; Coutinho, L. F. M.; LANCAS, F. M.; MAZO, Luiz Henrique. **Copper microelectrode as liquid chromatography detector for herbicide glyphosate.** *Electroanalysis* (New York), v. 19, p. 1223-1226, 2007.
6. COUTINHO, Cláudia F. B.; Coutinho, L. F. M.; NIXDORF, S. L.; Camara, C. A. P.; MAZO, Luiz Henrique; LANCAS, F. M. **Direct determination of glyphosate using hydrophilic interaction chromatography with coulometric detection at copper microelectrode.** *Analytica Chimica Acta*, v. 592, p. 30-35, 2007.

7. COUTINHO, Cláudia F. B.; MAZO, Luiz Henrique. **Complexos Metálicos Com o Herbicida Glifosato: Revisão**. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 2005.

7.2 Trabalhos completos publicados em anais de congressos relacionados à Tese

1. COUTINHO, Cláudia F. B.; SILVA, M. O.; MACHADO, Sergio A S.; MAZO, Luiz Henrique. **Influência do herbicida glifosato sobre a dissolução de cobre em tampão fosfato**. In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007.

2. COUTINHO, Cláudia F. B.; SILVA, M. O.; CALEGARO, M. L.; MACHADO, Sergio A S.; MAZO, Luiz Henrique. **Chronopotametric study and kinetic parameters determination of the copper dissolution in the presence of glyphosate**. In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia. XVI Simpósio brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007.

3. COUTINHO, Cláudia F. B.; Coutinho, L. F. M.; MAZO, Luiz Henrique; LANCAS, F. M.; NIXDORF, S. L.; Camara, C. A. P. **Determinação direta de glifosato utilizando CLAE aliada a detecção eletroquímica com microeletrodo de cobre**. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa-PB. 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007.

4. COUTINHO, Cláudia F. B.; Coutinho, L. F. M.; MAZO, Luiz Henrique; LANCAS, F. M.; NIXDORF, S. L.; Camara, C. A. P. **Desenvolvimento de instrumentação para a detecção amperométrica e coulométrica utilizando ultramicroeletrodos**. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa-PB. 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007.

5. COUTINHO, Cláudia F. B.; SILVA, M. O.; CALEGARO, M. L.; MAZO, Luiz Henrique; MACHADO, Sergio A S. **Efeito do herbicida glifosato sobre a dissolução e passivação do cobre em meio de fosfato**. In: 29ª Reunião Anual da

Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Química é energia: transforma a vida e preserva o ambiente, 2006. p. 55.

6. COUTINHO, Cláudia F. B.; SILVA, M. O.; CALEGARO, M. L.; MACHADO, Sergio A S.; MAZO, Luiz Henrique. **Estudo da dissolução do cobre por glifosato utilizando eletrodo de disco rotatório**. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Química é Energia: transforma a vida e preserva o ambiente, 2006. p. 72.

7. COUTINHO, Cláudia F. B.; MAZO, Luiz Henrique. **Estudo da complexação de Cu(II) com o herbicida glifosato utilizando voltametria de onda quadrada**. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas - MG. Química para o desenvolvimento sustentável e inclusão social, 2005.

8. COUTINHO, Cláudia F. B.; MAZO, Luiz Henrique; Al-Asfour, S. V.; CHIERICE, G. O. **Estudo eletroanalítico do herbicida glifosato e da fosfoetanolamina utilizando ultramicroeletrodo cobre**. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas - MG. Química para o desenvolvimento sustentável e inclusão social, 2005.

9. COUTINHO, Cláudia F. B.; MAZO, Luiz Henrique . **Spectrophotometric and electroanalytical study of copper(II) complexes with glyphosate..** In: XII Brazilian Meeting On Inorganic Chemistry, 2004, São Carlos. XII Brazilian Meeting On Inorganic Chemistry. São Carlos, 2004.

10. COUTINHO, Cláudia F. B.; Coutinho, L. F. M.; MAZO, Luiz Henrique; LANCAS, F. M.; NIXDORF, S. L.; Camara, C. A. P. . **Separation and direct determination of glyphosate using hydrophilic interaction chromatography with coulometric detection**. In: II Simpósio de Cromatografia, 2006, São Pedro. II Simpósio de Cromatografia, 2007.