

**Universidade de Brasília**

**Instituto de Química**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Desenvolvimento de um Sistema de Análise por Injeção em Fluxo  
com Fotoderivatização para Determinação de NNG em Glifosato**

**ERICK SOARES LINS**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Cristi Basile Dias**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca**

**Brasília/DF, 2013**

## Folha de Aprovação

*“A Ciência, meu rapaz, é feita de erros, mas de erros benéficos, pois conduzem pouco a pouco à verdade.”*

Jules Verne

*“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam.”*

I Coríntios 2:9

## **Agradecimentos**

À Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Cristi e ao Prof<sup>o</sup> Dr. Alexandre, por terem aceitado esta empreitada e pela parceria neste período, e à toda a equipe do AQQUA pelas incontáveis ajudas.

Ao Instituto de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ/IQ/UnB.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, à Companhia Monsanto e à Bioagri Laboratórios Ltda., pelo fornecimento de amostras, insumos e métodos utilizados neste projeto.

À minha família e amigos, pelo apoio constante.

A minha esposa por veementemente me impedir de desistir.

A Deus, por me dar alento, forças e ousadia quando parecia não haver soluções.

Dedicado a meu pequeno milagre e sua curiosidade científica.

## Resumo

N-nitrosoglifosato (NNG) é a principal impureza do produto técnico de Glifosato, o herbicida mais comercializado e consumido no mundo. Esta impureza é gerada durante os processos de síntese do Glifosato e, assim como outras N-Nitrosaminas, apresenta riscos toxicológicos graves. Por esta razão, existem para o NNG limites máximos regulatórios estabelecidos nacional e internacionalmente. Apesar desta relevância, poucos e complexos são os métodos disponíveis na literatura para sua determinação. Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um método analítico automatizado para a determinação de NNG em amostras de produto técnico e formulações de Glifosato, utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo – FIA, o qual se apresenta como um procedimento mais rápido, mais econômico, menos sujeito a interferência humana e a contaminações, além de proporcionar sensibilidade adequada ao atendimento ao limite regulatório de  $1,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ . Tendo em vista que as condições operacionais dos métodos existentes atualmente, especialmente etapas de aquecimento e adição de ácido em alta concentração, impõem dificuldades ao acoplamento em sistemas FIA, foi implementado um procedimento de derivatização fotoquímica. Neste processo, a molécula de NNG teve sua ligação N-NO clivada como resultado da interação da radiação ultravioleta de comprimento de onda 254 nm. Os íons nitrito resultantes desta etapa foram submetidos posteriormente à reação de Griess, permitindo detecção fotométrica no comprimento de onda de 540 nm. O dispositivo de detecção baseado em LED de cor verde, a câmara foto-reatora e o programa para controle de válvulas e aquisição de dados foram desenvolvidos no próprio laboratório. Uma etapa de extração em fase sólida foi inserida no sistema em fluxo com o objetivo de remover os componentes interferentes da matriz e pré-concentrar o analito, simultaneamente à fotoderivatização. Resultados qualitativos obtidos a partir de amostras reais de produto técnico de Glifosato demonstraram que o procedimento é efetivo, tendo sido observado o produto colorido da reação de Griess, sem haver necessidade de fortificação. Os resultados obtidos demonstram que a exploração da técnica é oportuna e vantajosa do ponto de vista analítico em relação aos métodos atualmente praticados.

## Abstract

N-nitrosoglyphosate (NNG) is the main impurity in technical Glyphosate, which is the world's most traded and consumed herbicide. That impurity is produced during the synthesis processes of Glyphosate and, like other N-Nitrosamines, poses strong toxicological risks. For this reason, there are maximum regulatory levels established at both national and international levels. In spite of its relevance, there are but a few, complex methods available in literature for that determination. The objective of this work is to develop an automated analytical method for the determination of NNG in technical Glyphosate and formulations, by means of a flow injection system – FIA, which is faster, less expensive, less subject to human interference and contaminations, providing adequate sensitivity in order to comply with the regulatory limit of  $1,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ . Considering that some operational conditions of the currently used methods, specially the heating and highly concentrated acid addition steps, impose difficulties to FIA-coupling, a photochemical derivatization process was implemented. In that process, the NNG molecule suffered the cleavage of the N-NO bond, as a result of the interaction with ultraviolet radiation and wavelength 254 nm. The nitrite ions generated in this step were later submitted to the Griess reaction, thus allowing photometric detection at wavelength 540 nm. The green LED-based detection device, the photo-reaction chamber, and the software for valve control and data acquisition were developed in the laboratory. A solid phase extraction step was added to the flow system with the purpose of removing interfering matrix components e to pre-concentrate the analyte, simultaneously with the photoderivatization. Qualitative results obtained from real samples of technical Glyphosate showed the effectiveness of the procedure, as the colour product of the Griess reaction was observed, without any standard addition. The results demonstrate that the further exploration of this technique is opportune and advantageous from the analytical point of view in relation to the methods currently used.

## Índice

1.	Introdução	1
2.	Revisão Bibliográfica	4
2.1.	Informações gerais quanto à utilização do herbicida Glifosato	5
2.2.	Regulação das impurezas toxicologicamente relevantes, em especial NNG	7
2.3.	Estratégias para determinação de NNG	9
2.4.	Fotoderivatização das N-nitrosaminas	14
2.5.	Automatização do método para determinação de NNG	17
2.6.	Fotoderivatização associada a sistemas FIA como estratégias de automação	21
2.7.	Objetivo	25
3.	Experimental	26
3.1.	Materiais	27
3.2.	Reagentes e Soluções	27
3.3.	Métodos	29
3.3.1.	Derivatização do NNG	29
3.3.1.1.	Derivatização Química	29
3.3.1.2.	Experimentos com reagentes alternativos para a denitrosilação	30
3.3.1.3.	Derivatização Fotoquímica	31
3.3.1.3.1.	Potência da lâmpada UV	31
3.3.1.3.2.	Tempo de exposição	32
3.3.2.	Sistemas de análise por injeção em fluxo	32
3.3.2.1.	Desenvolvimento do programa computacional para controle das válvulas e aquisição de sinal analítico	33
3.3.2.2.	Construção do detector fotométrico baseado em LED	33
3.3.2.3.	Sistema de análise em fluxo por multicomutação com fotoderivatização	34

<b>3.3.2.3.1.</b>	Otimização da reação de Griess	35
<b>3.3.2.3.2.</b>	Estudo dos parâmetros do método no sistema multicomutação	37
<b>3.3.2.3.3.</b>	Procedimento analítico	37
<b>3.3.2.3.4.</b>	Testes com amostras reais	38
<b>3.3.2.4.</b>	Sistema de fluxo monosegmentado com fotoderivatização	39
<b>3.3.2.4.1.</b>	Estudo dos parâmetros do método por sistema de fluxo monosegmentado	41
<b>3.3.2.4.2.</b>	Procedimento analítico	41
<b>3.3.2.4.3.</b>	Testes com amostras reais	42
<b>3.3.2.4.4.</b>	Estudo de interferência da matriz	43
<b>3.3.2.5.</b>	Experimentos com SPE simultâneo à fotoderivatização	44
<b>3.3.2.5.1.</b>	Montagem da coluna de SPE em linha	45
<b>3.3.2.5.2.</b>	Estudo dos parâmetros do método no sistema em fluxo com fotoderivatização e SPE combinados em linha	47
<b>3.3.2.5.3.</b>	Procedimento analítico	47
<b>3.3.2.5.4.</b>	Testes com amostras reais	48
<b>4.</b>	Resultados e Discussão	49
<b>4.1.</b>	Derivatização do NNG	50
<b>4.1.1.</b>	Derivatização Química	50
<b>4.1.2.</b>	Experimentos com reagentes alternativos para a denitrosilação	52
<b>4.1.3.</b>	Derivatização Fotoquímica	54
<b>4.1.3.1.</b>	Potência da lâmpada UV	55
<b>4.1.3.2.</b>	Tempo de exposição	59
<b>4.2.</b>	Sistemas de análise por injeção em fluxo	62
<b>4.2.1.</b>	Desenvolvimento do programa computacional para controle das válvulas e aquisição de sinal analítico	62
<b>4.2.2.</b>	Construção do detector fotométrico baseado em LED	64

<b>4.2.3.</b>	<b>Sistema de análise em fluxo por multicomutação com fotoderivatização</b>	<b>66</b>
<b>4.2.3.1.</b>	<b>Otimização da reação de Griess</b>	<b>66</b>
<b>4.2.3.2.</b>	<b>Estudo dos parâmetros do método no sistema multicomutação</b>	<b>69</b>
<b>4.2.3.3.</b>	<b>Testes com amostras reais</b>	<b>71</b>
<b>4.2.4.</b>	<b>Monosegmentado com fotoderivatização</b>	<b>72</b>
<b>4.2.4.1.</b>	<b>Estudo dos parâmetros do método por sistema de fluxo monosegmentado</b>	<b>73</b>
<b>4.2.4.2.</b>	<b>Testes com amostras reais</b>	<b>74</b>
<b>4.2.4.3.</b>	<b>Estudo de interferência da matriz</b>	<b>75</b>
<b>4.2.5.</b>	<b>Experimentos com SPE simultâneo à fotoderivatização</b>	<b>79</b>
<b>4.2.5.1.</b>	<b>Montagem da coluna de SPE em linha</b>	<b>81</b>
<b>4.2.5.2.</b>	<b>Estudo dos parâmetros do método no sistema com fotoderivatização e SPE combinados em linha</b>	<b>83</b>
<b>4.2.5.3.</b>	<b>Testes com amostras reais</b>	<b>85</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusões e Perspectivas</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>Referências</b>	<b>92</b>

## Lista de Abreviaturas e Acrônimos

<b>AGROFIT</b>	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CCD</b>	Cromatografia de Camada Delgada
<b>CENA/USP</b>	Centro de Energia Nuclear na Agricultura / Universidade de São Paulo
<b>DMS</b>	Dimetilsulfato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos EUA)
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Office (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)
<b>FIA</b>	Flow Injection System (Sistema de Análise por Injeção em Fluxo)
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
<b>IN</b>	Instrução Normativa
<b>INC</b>	Instrução Normativa Conjunta
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
<b>LED</b>	Light Emitting Diode (Diodo Emissor de Luz)
<b>NNG</b>	N-nitrosoglifosato
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MDIC</b>	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
<b>NCM</b>	Nomenclatura Comum Mercosul
<b>NDMA</b>	N-nitrosodimetilamina
<b>NED</b>	N-(1-naftiletilenodiamino)
<b>p-DAC</b>	p-dimetilaminocinamaldeído
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>RSD</b>	Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Relativo)
<b>SAM</b>	Sulfanilamida
<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction (Extração em fase sólida)
<b>UV</b>	Ultravioleta

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Descrição resumida das diferentes composições do reagente de Griess.	36
<b>Tabela 2</b> – Resultados do experimento de eficiência da derivatização química de NNG.	51
<b>Tabela 3</b> – Resultados de reação de Griess com NNG após derivatização ácida e após derivatização fotoquímica.	57
<b>Tabela 4</b> – Características técnicas das lâmpadas UV utilizadas. (fonte: Specification Sheet GCF11DS/G23/SE/OF e HNS 4W G5 (G4T5/OF) - OSRAM GmbH)	59
<b>Tabela 5</b> – Resultados do experimento de verificação da interferência do glifosato na reação de Griess com nitrito.	75
<b>Tabela 6</b> – Resultados do experimento de verificação da interferência do glifosato na reação de Griess com NNG em derivatização química e em derivatização fotoquímica.	78
<b>Tabela 7</b> – Relação de outras impurezas pertencentes à família das N-nitrosaminas, em agrotóxicos regulados. Adaptado da INC nº 2/2008.	90

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Equação química representando a síntese do Glifosato. Adaptado de Brown.	7
<b>Figura 2</b> – Estrutura das moléculas (a) Glifosato e (b) N-nitrosoglifosato – NNG.	10
<b>Figura 3</b> – Mecanismo da reação de Griess com Sulfanilamida e N-(1-naftiletilenodiamino). Adaptado de Patton <i>et al.</i>	12
<b>Figura 4</b> – Representação da estrutura ressonante das N-nitrosaminas.	15
<b>Figura 5</b> – Estrutura de uma N-nitrosamina em meio ácido. Adaptado de Chow.	16
<b>Figura 6</b> – Clivagem homolítica da ligação N-NO de uma N-nitrosamina por radiação UV.	16
<b>Figura 7</b> – Clivagem heterolítica da ligação N-NO de uma N-nitrosamina por radiação UV.	16
<b>Figura 8</b> – Representação esquemática de um sistema de análise em fluxo simplificado. A) Amostra, T) Transportador, R) Reagente, B) Bobina reacional, D) Detector e W) Descarte. Adaptado de Dias <i>et al.</i>	19
<b>Figura 9</b> – Representação esquemática do dispositivo de detecção	34
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática do sistema de análise por injeção em fluxo baseado em multicomutação. B) Bomba peristáltica, T) Transportador (água deionizada), V1 e V2) Válvulas solenoides, x e y) confluências, UV) Foto-reator (com lâmpada de 11 W), D) Detector e W) descarte.	35
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática do sistema de análise em fluxo monosegmentado. B) Bomba peristáltica, T) Transportador, UV) Foto-reator, D) Detector e W) descarte. As linhas tracejadas representam os canais no interior do injetor; as linhas sólidas correspondem às alças de tubos de PTFE externas. Na figura está representada a posição de amostragem, e a seta indica o movimento da peça interna do injetor quando acionada a posição de injeção, alterando os caminhos das soluções.	38
<b>Figura 11</b> – Injetor comutador, com alavanca para mudança de posição, alça de amostragem de PTFE e entradas e saídas de fluxo. Adaptado de Dias <i>et al.</i>	39
<b>Figura 12</b> – Representação esquemática do sistema de análise em fluxo	40

monosegmentado. 1) Posição de amostragem; 2) Posição de injeção; B) Bomba peristáltica, T) Transportador (água deionizada), UV) Foto-reator, D) Detector e W) descarte. As linhas tracejadas representam os canais no interior do injetor; as linhas sólidas correspondem às alças de tubos de PTFE externas. A seta indica o movimento da peça interna do injetor entre as posições de amostragem e injeção.

**Figura 13** – Registro do sinal analítico e formação da zona de amostra produzida pelo sistema monosegmentado. 41

**Figura 14** – Esquema de montagem da fase sólida em fluxo. Adaptado de Dias *et al.* 45

**Figura 15** – Representação esquemática do sistema de análise em fluxo com SPE e fotoderivatização em linha. 1) posição de amostragem, 2) posição de injeção. B) Bomba peristáltica, SPE) coluna de extração em fase sólida, UV) Foto-reator (com lâmpada de 11 W), D) Detector e W) descarte. As linhas tracejadas representam os canais no interior do injetor; as linhas sólidas correspondem às alças de tubos de PTFE externas. A seta indica o movimento da peça interna do injetor quando acionada a posição de injeção, alterando os caminhos das soluções. 46

**Figura 16** – Resultados dos testes de derivatização química com o reagente metilante DMS. A) Espectro do produto da reação de Griess após derivatização do NNG a  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  com DMS em DMSO; B) Espectro da solução de NNG a  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em DMSO com adição do reagente de Griess, sem DMS. 53

**Figura 17** – Mecanismo de fotoderivatização de uma N-nitrosamina, em duas possíveis rotas reacionais: 1) clivagem heterolítica, resultando em íons nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ); 2) clivagem homolítica, resultando em radicais nitrosil ( $\text{NO}\bullet$ ). Adaptado de Lee. 54

**Figura 18** – Distribuição espectral da lâmpada UV de 11 W: A) lâmpada geradora de ozônio; B) lâmpada não-geradora de ozônio. Fonte: OSRAM UV-C Puritec HNS germicidal lamps Technical Information Brochure. 58

<b>Figura 19</b> – Resultados de reação de Griess com NNG 1,0 mg L <sup>-1</sup> conforme tempo de exposição à radiação UV.	60
<b>Figura 20</b> – Foto-reator aberto, mostrando lâmpada, seu reator e ventoinha, além das entradas de tubo de PTFE para inserção da amostra em fluxo.	61
<b>Figura 21</b> – Tela do programa elaborado para controle de válvulas solenoides e aquisição de sinal analítico.	63
<b>Figura 22</b> – Fluxograma de operação do programa.	64
<b>Figura 23</b> – Foto do dispositivo de detecção. A) Detector montado com cubeta e botões de ajuste de ganho e intensidade do LED; B) Cubeta de fluxo; C) Detector aberto, em que se vê o LED, o Fotodiodo e o espaço para inserção da cubeta.	65
<b>Figura 24</b> – A) Registro dos sinais analíticos do branco em triplicata; B) Registro dos sinais analíticos de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> a 0,15 mg L <sup>-1</sup> em triplicata. Condições: Transportador = água deionizada, Vazão = 0,750 mL min <sup>-1</sup> , tempo de acionamento das válvulas V1 e V2 = 20 s, bobina reacional = 100 cm.	67
<b>Figura 25</b> – A) Registro dos sinais analíticos do branco com NED/SAM diluído em triplicata; B) Registro dos sinais analíticos de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> a 0,15 mg L <sup>-1</sup> com NED/SAM diluído em triplicata. Condições: Transportador = água deionizada, Vazão = 0,750 mL min <sup>-1</sup> , tempo de acionamento das válvulas V1 e V2 = 20 s, bobina reacional = 100 cm.	68
<b>Figura 26</b> – Curva de calibração com solução padrão de NNG em 5 níveis mais o branco obtida no sistema por multicomutação. Condições: Vazão = 0,750 mL min <sup>-1</sup> , potência da lâmpada = 11 W, tempo de exposição = 20 s. A área sombreada corresponde a sinais desconsiderados no experimento.	70
<b>Figura 27</b> – Curva analítica obtida com o sistema em fluxo por multicomutação.	70
<b>Figura 28</b> – Sinais analíticos dos testes de branco de reagente, com adições de ácido para neutralização da solução de extração.	71
<b>Figura 29</b> – Curva de calibração do sistema em fluxo monosegmentado em 3 níveis mais o branco, em duplicata. Condições: Vazão = 0,750 mL min <sup>-1</sup> , potência da lâmpada = 11 W, tempo de exposição = 20 s. A área sombreada corresponde a sinais desconsiderados no experimento.	73
<b>Figura 30</b> – Curva analítica do sistema em fluxo monosegmentado.	73

- Figura 31** – Sinais analíticos obtidos de testes com amostras reais em FIA monosegmentado com fotoderivatização. As setas indicam os sinais do analito, entre bolhas. 74
- Figura 32** – Espectros na região do visível de produtos da reação de Griess após derivatização química do NNG: A) NNG em solução aquosa a  $19,8 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ); B) NNG em mistura aquosa com glifosato na proporção 1:1; C) NNG em mistura com glifosato na proporção 1:10; D) NNG em solução aquosa a  $7,93 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ); E) NNG em mistura aquosa com glifosato na proporção 1:100; F) NNG em solução aquosa a  $0,79 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ); G) NNG em mistura aquosa com glifosato na proporção 1:1000. 76
- Figura 33** – A) cartucho SPE com solução padrão de NNG após fotoderivatização; B) produto colorido formado a partir da eluição da espécie derivatizada retida com reagente de Griess. 80
- Figura 34** – A) Coluna de extração em fase sólida em fluxo antes da utilização; B) produto colorido durante eluição com reagente de Griess. 82
- Figura 35** – Sistema de análise por injeção em fluxo com: (A) soluções de amostra e reagente de Griess; (B) bomba peristáltica; (C) injetor comutador; (D) detector; (E) bobina reacional; (F) foto-reator com coluna de SPE em linha em seu interior e (W) descarte. 83
- Figura 36** – Registro dos sinais analíticos de solução padrão de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  em FIA com SPE e fotoderivatização simultâneos, após eluição com reagente de Griess. Condições: Vazão =  $0,750 \text{ mL min}^{-1}$ , potência da lâmpada = 11 W, tempo de exposição = 5 min, Fase sólida = troca aniônica (amônio quaternário). 84
- Figura 37** – (A): solução final da análise de uma amostra de produto técnico de Glifosato não fortificada, submetida ao sistema de análise em fluxo com extração em fase sólida e fotoderivatização em linha; e (B): extrato da amostra antes da corrida analítica. 85

# ***1. Introdução***

## ***Introdução***

Os métodos analíticos para determinação de impurezas toxicologicamente relevantes de agrotóxicos possuem atualmente uma dimensão incompatível com sua importância real. Há uma quantidade restrita de procedimentos publicados, contrastando com a variedade incomensurável de ingredientes ativos no mercado, em produtos técnicos e formulações diversas, cuja composição detalhada é tratada como sigilosa. Isto impõe dificuldades às abordagens analíticas, uma vez que o desenvolvimento de um método pressupõe o conhecimento da matriz em que se pretende fazer a determinação.

Além disso, em termos quantitativos, os produtos técnicos e formulações comercializados somam um volume muito grande, o que requer dos organismos de regulação ações concretas e abrangentes para evitar que tais produtos cheguem aos produtores e às lavouras trazendo consigo potenciais riscos à saúde do aplicador e, em última instância, do consumidor de alimentos. Neste sentido, métodos analíticos rápidos e econômicos constituem necessidades essenciais dos órgãos fiscalizadores para atendimento de suas demandas, o que converge com as principais soluções oferecidas pelos sistemas de análises por injeção em fluxo – FIA.

O herbicida mais comercializado no mundo, o Glifosato, possui duas impurezas toxicologicamente relevantes e que são inerentes ao seu processo de produção, a saber, Formaldeído e N-nitrosoglifosato – NNG. Estas impurezas são reguladas pelo Food and Agriculture Office – FAO e, no Brasil, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Há, no entanto, uma crítica escassez na literatura científica de métodos analíticos para a determinação de NNG em produtos técnicos de Glifosato, sendo que os únicos existentes envolvem procedimentos complexos, instrumentação de alto custo e quantidades consideráveis de reagentes. Por esta razão, o desenvolvimento de métodos mais rápidos, econômicos e eficientes é oportuno, especialmente se for considerada a estratégia FIA.

Tendo em vista este contexto, o presente trabalho visa o desenvolvimento de método analítico fotométrico para determinação de N-nitrosoglifosato em amostras de produto técnico e formulações do herbicida Glifosato, automatizado por um sistema de análise por injeção em fluxo, contendo para tanto uma etapa de derivatização fotoquímica.

## ***2. Revisão Bibliográfica***

## ***Revisão Bibliográfica***

### **2.1. Informações gerais quanto à utilização do herbicida Glifosato**

A utilização de agrotóxicos nas lavouras está diretamente ligada ao notável aumento de produtividade do agronegócio brasileiro nos últimos anos, um crescimento tal que deu ao país alcunhas como “celeiro do mundo”. Atualmente, o Brasil é o 3º maior exportador de alimentos do planeta, e vem liderando em produção e exportação de commodities como café, laranja e cana-de-açúcar, sendo ainda o segundo maior produtor de soja, mamão, abacaxi, carne bovina e de frango, entre outros produtos, de acordo com dados da FAO de 2011.<sup>1</sup> É também o maior consumidor de agrotóxicos do mundo,<sup>2</sup> fato diretamente relacionado com o aumento da produtividade.

A despeito deste efeito positivo, os agrotóxicos também impõem preocupações, e conseqüentemente, ações regulatórias focadas principalmente em 3 itens: i) impacto ambiental, pela sua eventual deriva e contaminação de rios, fontes e solos; ii) a segurança do alimento produzido, devido a presença de resíduos e metabólitos em níveis nocivos à saúde do consumidor; e iii) a segurança do operador durante a aplicação, em razão da presença de substâncias tóxicas no agroquímico, seja resultante de transformação no ambiente ou impurezas do processo de sua fabricação. A regulação, portanto, é focada nas necessidades para o aumento da produção de alimentos, os quais sejam também seguros do ponto de vista dos alimentos, ambiental e da exposição da população residente nas áreas rurais.

Algumas culturas que possuem grande importância econômica, como trigo, soja e milho, estão sujeitas ao ataque de ervas daninhas e é daí que surge a necessidade de aplicação de herbicidas nas lavouras. Esta necessidade, apesar de patente em muitos casos, não faz prescindir-se da aferição da identidade e qualidade destes defensivos agrícolas, a qual é feita em essência por análise laboratorial.

Um dos herbicidas mais utilizados é o Glifosato (N-(fosfometil)glicina, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P),<sup>3</sup> aplicado em diversas culturas em todo o mundo. Trata-se de um herbicida

sistêmico não-seletivo, absorvido pelas folhas e que interfere na síntese de aminoácidos aromáticos necessários à formação de proteínas nas plantas alvo.<sup>4,5</sup> Sua aplicação ocorre principalmente no pós-emergência de plantas infestantes em culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citrus, coco, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagens, pêra, pêssego, seringueira, soja, trigo e uva.<sup>6</sup> No sistema Agrofit do Ministério da Agricultura do Brasil (MAPA), conforme dados obtidos de agosto de 2013, existem 57 produtos formulados registrados e de uso autorizado com o ingrediente ativo Glifosato, pertencentes a várias empresas.<sup>7</sup> A patente da companhia desenvolvedora da molécula, a Monsanto, expirou no ano 2000, e desde então muitas outras companhias vêm produzindo e comercializando produtos técnicos e formulações do ingrediente ativo Glifosato. De acordo com dados do sistema AliceWeb, do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), só no ano de 2012 (período de janeiro a dezembro), foram exportados 5.296.875 kg de herbicidas a base de glifosato/sais/imazaquim/lactofen (NCM 3808.93.24), num montante total de US\$27.166.235. No mesmo período o Brasil ainda importou 10.815.102 kg desses produtos, equivalente a US\$21.532.458.<sup>8</sup> No arcabouço legal do MAPA, existem 49 atos normativos que relacionam-se ao controle do Glifosato de alguma maneira.<sup>9</sup>

Glifosato é considerado de baixa toxicidade a mamíferos, com LD<sub>50</sub> acima de 2000 mg/kg de peso corpóreo (dose oral, em ratos),<sup>10,11</sup> sendo inclusive classificado pelo Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) como substância química do Grupo E, isto é, substâncias químicas das quais não há evidência de carcinogenicidade em humanos.<sup>12</sup> O advento das culturas transgênicas intensificou consideravelmente o uso de Glifosato. A própria Monsanto desenvolveu e comercializa sementes de culturas geneticamente modificadas com a marca RR (*RoundupReady*), indicando que a planta é resistente ao mecanismo de ação do glifosato a nível celular.<sup>13,14</sup> Com o aumento de lavouras resistentes nas últimas décadas,<sup>15</sup> o uso deste herbicida pôde também ser aumentado na busca de maior eficiência na eliminação das ervas daninhas.

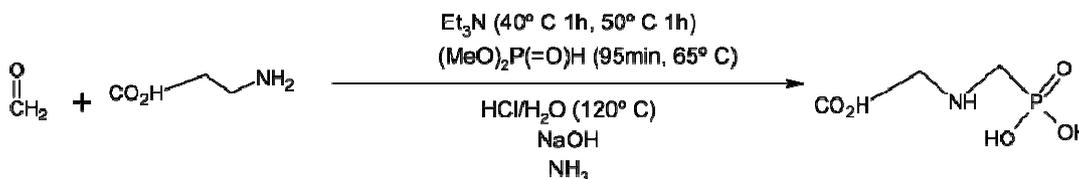
Além do uso agrícola, a aplicação urbana de Glifosato é considerável: em algumas cidades, é aspergido em calçadas e fendas dos pavimentos, para impedir o

crescimento de ervas, aplicado em trilhos ferroviários e até mesmo para acabar com vegetação aquática indesejada. Com isto, atribui-se em grande parte a estas práticas a contaminação de águas superficiais por Glifosato, sendo estimado que até 24 % do herbicida aplicado em terrenos pavimentados sejam carreados pela água.<sup>16,17</sup>

## 2.2. Regulação das impurezas toxicologicamente relevantes, em especial NNG

O processo de produção de Glifosato gera impurezas com potencial carcinogênico, sendo NNG (N-nitrosoglifosato) a principal, e cujo nível máximo permitido regulamentado pela FAO é 1,0 mg kg<sup>-1</sup>.<sup>11</sup> Outras impurezas são conhecidas, como glifosina, ácido hidroximetilfosfônico, ácido iminobismetilfosfínico, ácido aminometil fosfínico, N-metilglifosato<sup>18</sup> e Formaldeído, sendo que apenas este último é objeto de regulação juntamente com o NNG em virtude de seu risco toxicológico. De fato, a IUPAC define impurezas relevantes de produtos técnicos de agrotóxicos como aquelas que podem “exibir efeitos tóxicos pronunciados quando comparados aos do ingrediente ativo, afetar a fitotoxicidade ou as propriedades físicas das formulações, resultar em resíduos indesejáveis nos alimentos ou causar contaminação ambiental.”<sup>19</sup>

O NNG é um subproduto da síntese de Glifosato, e tem duas possíveis origens principais: i) devido à presença de nitrito na água utilizada no processo, ou ii) devido a presença de espécies [NO]<sub>x</sub> no ar utilizado na etapa de oxidação.<sup>11</sup> As etapas da produção de Glifosato já foram estudadas, levando a proposições de rotas sintéticas diversas, sendo a mais comumente utilizada a que é apresentada abaixo.



**Figura 1 – Equação química representando a síntese do Glifosato.** Adaptado de Brown.<sup>20</sup>

Apesar da origem conhecida e amplamente comentada neste levantamento, não foram encontradas na literatura descrições de rotas ou mecanismos que indicassem a geração de NNG durante o processo de síntese do glifosato. Todavia, o fato de espécies  $[NO]_x$  incluindo nitrito e nitrato serem ubíquas, agrava a necessidade de atenção, já que não são necessárias condições muito específicas para que ocorra sua reação com glifosato, gerando assim NNG tanto no processo sintético do herbicida como no ambiente.

A preocupação com os riscos à saúde impostos pelo NNG surgiu no final da década de 1970, quando se observaram os primeiros registros de metodologias analíticas objetivando sua determinação em algumas matrizes de interesse. Em documento intitulado “*Glyphosate, review and evaluation of TOX data*” de 1978, a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos – US EPA, relatou uma avaliação a respeito da exposição do aplicador ao NNG. Foi utilizado o produto *Roundup* contendo  $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$  de NNG, e foram feitas medições de glifosato e NNG no ar, nas luvas, em compressas de gaze localizadas no corpo do operador e na folhagem, com o objetivo de determiná-los no ar respirado, e nas superfícies da pele cobertas e descobertas. O princípio do método analítico utilizado se baseava em detecção espectrofotométrica após reação de Griess. Os resultados da pesquisa foram considerados inconclusivos, pois, embora o método analítico tivesse seu desempenho verificado e sua efetividade comprovada, o delineamento amostral foi considerado inadequado ao propósito.<sup>21</sup>

NNG pertence à família das N-nitrosaminas, as quais possuem conhecidos efeitos carcinogênicos, inclusive na ocorrência de câncer gástrico.<sup>22</sup> Há indícios, ainda sob investigação, de que N-nitrosaminas estejam também associadas ao desenvolvimento do mal de Alzheimer, com resultados mostrando que a exposição a baixos níveis dessas substâncias podem causar degeneração cerebral semelhante a Alzheimer, demência, diabetes, esteatose hepática e obesidade.<sup>23</sup>

N-nitrosodimetilamina, ou NDMA, é a molécula mais simples da família das N-nitrosaminas, e apresenta efeitos tóxicos em diversas espécies, inclusive humanos, sendo o principal a necrose centrilobular severa do fígado. Os dados obtidos demonstraram também o efeito carcinogênico do NDMA em ratos, que pode induzir

carcinomas hepatocelulares e tumores nos rins e pulmões, além de duto biliar e cavidades nasais. De acordo com outras referências, cerca de 300 compostos da família das nitrosaminas foram avaliados, e 90% foram considerados carcinogênicos em uma grande variedade de animais testados.<sup>24</sup>

No Brasil, a regulação de agrotóxicos compete ao Ministério da Agricultura, juntamente com ANVISA e IBAMA. A Instrução Normativa Conjunta Nº 2, de 20 de Junho de 2008, da Secretaria de Defesa Agropecuária,<sup>25</sup> estabelece o limite máximo nacional para a presença de NNG em produtos do ingrediente ativo Glifosato, o qual coincide com o designado pela FAO, isto é, 1,0 mg kg<sup>-1</sup>. Este limite se estende para as formulações líquidas, no caso, como 1,0 mg de NNG por litro de produto.

Tendo em vista seu potencial carcinogênico, os riscos impostos tanto ao aplicador quanto ao meio ambiente, bem como ao consumidor de alimentos e sua ampla presença nas lavouras e águas, o problema analítico se apresenta, portanto, como a necessidade de determinação quantitativa de N-nitrosoglifosato (NNG) no produto técnico Glifosato e formulações, com vistas à verificação do atendimento ao limite regulatório.

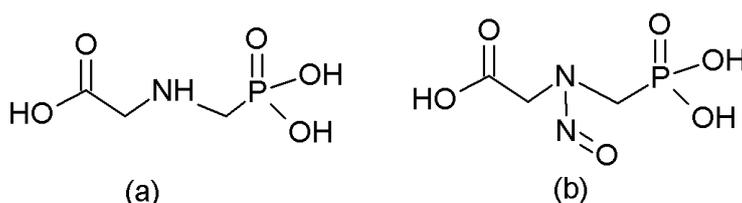
### **2.3. Estratégias para determinação de NNG**

Desde a década de 1970, pesquisadores vêm desenvolvendo métodos analíticos para a determinação de NNG ou para, por meio deste, realizar a determinação indireta de Glifosato.

Friestad *et al.* em 1976,<sup>26</sup> de Souza *et al.* em 1999,<sup>27</sup> e Teófilo *et al.* em 2004<sup>28</sup> apresentaram métodos baseados em polarografia. Segundo estes autores, diferentemente do NNG, o glifosato é polarograficamente inativo, estando ambos em meio ácido. Porém, segundo Pastore *et al.*,<sup>29</sup> a utilização de polarografia de pulso diferencial do NNG não é conveniente, já que pode ser inibida por compostos da matriz que venham a adsorver na superfície da gota de mercúrio impedindo a redução do analito. Além disso, o acoplamento das etapas de tais procedimentos em um sistema

de análises em fluxo não é simples, fato que resultou na objeção a esta técnica no presente projeto.

Em contrapartida, seguindo até mesmo a tendência de avanço tecnológico, os métodos cromatográficos ganharam importância. De fato, os principais métodos analíticos encontrados na literatura para determinação de NNG em Glifosato são baseados nessa técnica. Em geral, possuem como característica comum uma etapa de derivatização e conseguinte determinação espectrofotométrica do produto oriundo da Reação de Griess. Isto foi necessário porque a molécula alvo não possui cromóforos ou fluoróforos em sua estrutura, os quais são justamente o alvo das identificações das técnicas em questão. O procedimento de derivatização citado possibilita conduzir a detecção espectrofotométrica na região visível. Ademais, as moléculas de NNG e glifosato (o constituinte majoritário da amostra) possuem grande semelhança estrutural (Figura 2) e funcional, o que reflete em características físicas e químicas aproximadas. Esta similaridade dificulta processos de separação que se baseiem nas diferenças de tais características, como cromatografia, membranas de separação, extrações líquido-líquido ou em fase sólida, para citar alguns exemplos. A presença do grupo nitroso (-NO) é a única diferença real entre as estruturas, e não se obteve na literatura evidências ou dados que demonstrem em que grau isto gera diferenças nas propriedades físico-químicas.



**Figura 2 – Estrutura das moléculas (a) glifosato e (b) N-nitrosoglifosato – NNG.**

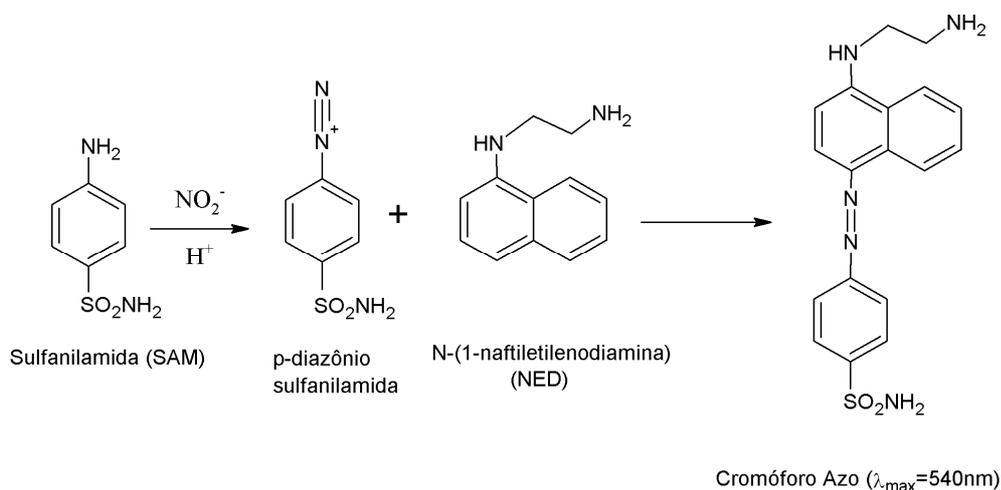
É justamente no uso do grupo nitroso que consiste a derivatização utilizada para a determinação do NNG. O processo de derivatização possui definições bem estabelecidas na Química Analítica, sendo que a explanação mais clara e sucinta seja talvez a proposta por Harris, que a define como um processo em que a substância objeto da análise é modificada quimicamente de maneira a permitir ou facilitar sua

detecção ou sua separação dos demais constituintes da matriz.<sup>30</sup> Esta conceituação pode ser explorada em termos práticos na busca por pelo aumento da sensibilidade e seletividade do método. Estes dois objetivos, conforme sumarizado por Lores,<sup>31</sup> podem ser atingidos, respectivamente: i) introduzindo-se cromóforos ou fluoróforos, ou obtendo-se um composto diferente com resposta mais intensa; e ii) aplicando-se uma reação de derivatização específica, que altere somente o composto de interesse em uma matriz complexa, tornando seletiva sua identificação.

No caso em questão, para determinação de compostos nitrosados, a derivatização consiste justamente na retirada do grupo nitroso para posterior reação com reagentes cromogênicos. Nos métodos levantados neste trabalho, de modo geral, esta retirada é alcançada por meio de reação do NNG com ácido mineral em concentração relativamente alta e aquecimento. Este procedimento é aplicável também para outras N-nitrosaminas.<sup>32,33,34</sup>

Ao longo dos anos, o desenvolvimento de métodos para determinação de NNG seguiu este mesmo princípio de derivatização com posterior detecção espectrofotométrica. O registro mais antigo pertence à companhia Monsanto, com o método AQC 684 de 1986.<sup>35</sup> Este método consistia em realizar a clivagem da ligação N-NO com HBr juntamente com o Reagente de Griess após separação do analito por HPLC. O método AQC 1140 de 2011,<sup>36</sup> aplica-se a amostras de formulações líquidas, porém obedece ao mesmo princípio. Em ambos os casos, HBr é o reagente de denitrosilação, utilizado em altas concentrações (cerca de 96 mL por litro de solução colorimétrica nas amostras líquidas e cerca de 240 mL por litro no caso das amostras sólidas). A bobina para a reação pós-coluna é mantida em aquecimento a 97 °C, e o produto é detectado por espectrofotometria na região Ultra-Violeta – UV. Como desvantagens, este método possui o longo tempo requerido pelo procedimento, as grandes quantidades de reagentes, a instrumentação complexa e o fato de o HBr interferir negativamente na reação ao reagir com nitrito gerando a espécie relativamente estável NOBr,<sup>32</sup> possibilitando assim a subestimação do analito.

O reagente colorimétrico de mais ampla aplicação consiste em uma mistura de Sulfanilamida (SAM) e N-(1-Naftiletlenodiamina) (NED), e é com estas substâncias que a espécie nitrito oriunda da clivagem da N-nitrosamina reage para geração de um produto colorido. Primeiramente, o nitrito realiza a diazotação da Sulfanilamida em presença de ácido, posteriormente ocorrendo seu acoplamento azo com N-(1-naftiletlenodiamina), o que resultará no produto de coloração rósea que apresenta absorção em comprimento de onda de 540 nm (Figura 3). Esta reação foi concebida pelo químico alemão Johann Peter Griess (1829-1888), e já é consagrada na literatura científica, tendo sido amplamente estudada, aperfeiçoada e até mesmo variada na aplicação em diversos campos como análises médicas, ambientais e forenses ao longo dos anos. De fato, a quantificação de íons nitrito por esta estratégia é utilizada para monitoramento no organismo humano,<sup>37</sup> assim como em amostras ambientais<sup>38</sup> e na área forense.<sup>39</sup> A Reação de Griess é um caso de sucesso na Química Analítica, já que tem como vantagens a sua simplicidade, rapidez e especificidade aliada à versatilidade. Ou seja, é um método específico para determinação de nitrito, mas que pode ser adaptado à determinação de nitrato, N-nitrosaminas diversas e outros compostos nitrosados conforme objetivo, portanto perfeitamente aplicável à determinação de NNG.



**Figura 3 – Mecanismo da reação de Griess com Sulfanilamida e N-(1-naftiletlenodiamina).** Adaptado de Patton *et al.*<sup>40</sup>

Em 1989, Pastore *et al.* propuseram um método para a determinação de NNG em amostras de Glifosato utilizando cromatografia de íons.<sup>29</sup> O artigo apresenta procedimentos de recuperação do NNG adicionado a amostras reais de Glifosato, em que NNG era sintetizado a partir do glifosato em solução básica, ao adicionar NaNO<sub>2</sub> aquoso ou borbulhar N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Isto demonstra um ponto crítico aos procedimentos de derivatização, já que o glifosato presente poderia, em princípio, reagir com o grupo nitrosil ou íons nitrito oriundos da clivagem do NNG, impedindo-os de participar da Reação de Griess. O procedimento baseia-se na completa desprotonação do NNG em meio básico (pH > 11), fazendo-o ser retido na coluna aniônica e eluindo-o com solução de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Neste caso, a separação prévia do Glifosato é fundamental, já que este possui comportamento muito semelhante ao NNG em termos de ionização e está presente em quantidade muito maior, talvez capaz de saturar a coluna aniônica. Este método requer ainda uma instrumentação específica, bem como respectivas condições operacionais para a cromatografia de íons.

Em 2007, Kim *et al.* desenvolveram um procedimento mais simples que aquele adotado como de referência – qual seja, o método desenvolvido pela companhia Monsanto – utilizando o mesmo princípio de derivatização química e reação colorimétrica.<sup>41</sup> A derivatização foi feita com HCl a 4,5 mol L<sup>-1</sup> em mistura concomitante com solução do Reagente de Griess, sob aquecimento a 95°C por 15 minutos. O trabalho se propõe a ser um procedimento completo em linha, excetuando uma etapa de preparo de amostra. O método foi conduzido com menor quantidade de solventes e ácidos, além da redução de reagentes e de descartes declarada de cerca de 25 %, e maior rapidez de análise em razão da combinação das etapas de denitrosilação e reação de Griess. No entanto, possuía ainda uma relativa complexidade operacional, ao requerer bombas de HPLC, uma etapa de resfriamento após o aquecimento e detector de arranjo de diodos. O artigo apresenta resultados de estudos de algumas figuras de mérito, utilizando método da adição de padrão.

Um trabalho que despertou interesse por trazer uma abordagem diferente ao problema analítico foi o elaborado por Young *et al.* em 1977, que apresentou um método baseado em cromatografia de camada delgada para determinação indireta de

glifosato em amostras de raízes e folhas, por meio de seu derivado nitrosado em uma reação luminescente.<sup>42</sup> NNG era preparado a partir de glifosato em solução de HCl por meio da adição de NaNO<sub>2</sub>. Posteriormente, este produto era irradiado por uma lâmpada UV por 10 minutos e recebia os reagentes fluorescamina ou cloreto de difenilamina-paládio e posteriormente analisada por cromatografia de camada delgada (CCD). A derivatização em questão consiste na clivagem da ligação N-NO pela radiação UV e o íon radical nitrosil (NO•) liberado desta clivagem é rapidamente convertido a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em meio aquoso,<sup>32</sup> podendo então seguir adiante na Reação de Griess conforme mecanismo. Este foi o primeiro registro da tentativa de derivatização do NNG utilizando radiação UV em vez de ácidos, e, embora não fosse o objetivo primário do trabalho, o próprio autor sugere ao final do artigo que o método descrito poderia ser eventualmente aplicado à determinação de NNG em amostras ambientais. Este trabalho demonstrou, portanto, que a derivatização ácida não é a única maneira de se obter íons nitrito a partir do NNG, e que a derivatização fotoquímica é viável.

#### **2.4. Fotoderivatização das N-nitrosaminas**

A Fotoderivatização, ou derivatização fotoquímica, mostra-se uma boa alternativa à abordagem dos métodos convencionais, na medida em que provê condições mais controladas de operação e redução de reagentes. Diferentemente da derivatização química convencional, os “reagentes adicionados” neste caso são fótons, e assim fatores como comprimento de onda da radiação eletromagnética, sua intensidade e o tempo de exposição para que a reação desejada se processe podem ser facilmente ajustados e otimizados. Deste modo, especialmente no caso de derivatização de N-nitrosaminas, as quantidades de ácido podem ser reduzidas, e a etapa de aquecimento pode ser abolida.

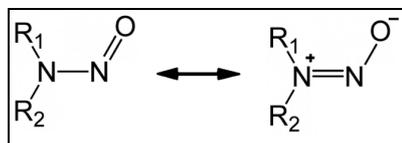
Curiosamente, conforme mencionado no item anterior, um dos primeiros métodos publicados para a quantificação de glifosato baseava-se na determinação do produto da fotoderivatização posterior à transformação daquele em NNG.<sup>42</sup> Este método, todavia, tem como desvantagens o grande número de etapas, algumas delas de longa duração, além do uso de reagentes mais complicados de se obter e

manipular, como difenilamina e cloreto de paládio. Por outro lado, já demonstra um registro antigo da possibilidade do uso de fotoderivatização para detecção de N-nitrosaminas, incluindo o NNG.

É sabido que as N-nitrosaminas, em uma determinada condição de pH, são fotolábeis – isto é, sofrem clivagens ao absorver radiação eletromagnética de energia adequada, retirando-se assim o grupo nitroso.<sup>43</sup> Em contrapartida, a molécula de glifosato não sofre fotólise por tal exposição,<sup>11</sup> o que torna o método altamente seletivo na medida em que o componente majoritário da matriz se comporta distintamente do analito.

A fotoquímica das N-nitrosaminas tem sido amplamente investigada, e alguns autores propuseram mecanismos reacionais para a derivatização fotoquímica de N-nitrosaminas, especialmente N-nitrosodimetilamina (NDMA).<sup>44</sup> Não há na literatura científica descrição alguma das propriedades fotoquímicas do NNG em específico, tampouco de suas propriedades físico-químicas. Abaixo são listadas algumas características comuns da família das N-nitrosaminas, importantes para a otimização de condições experimentais do método de determinação de NNG baseado em reação fotolítica:

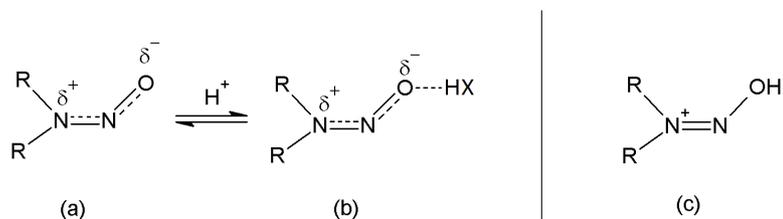
1. As N-nitrosaminas são categorizadas como *zwitterions*, possuindo estrutura ressonante conforme ilustrado na Figura 4, o que lhes confere estabilidade considerável.



**Figura 4 – Representação da estrutura ressonante das N-nitrosaminas.**

2. Pela extensão da contribuição da forma polar dessas moléculas, é sabido que a densidade de carga eletrônica concentra-se no átomo de oxigênio, mas não no átomo de nitrogênio da amina, favorecendo a protonação em meio ácido naquela terminação.<sup>45</sup>

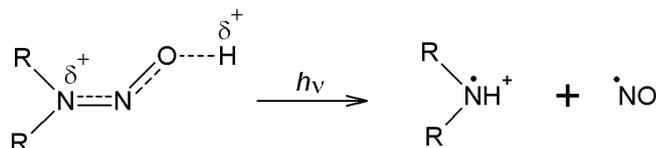
3. N-nitrosaminas neutras ou protonadas não são fotolábeis, então é sugerido que a espécie que sofre de fato fotoreações seja o complexo ácido, conforme estrutura (b) na Figura 5.



**Figura 5 – Estrutura de uma N-nitrosamina em meio ácido.** Adaptado de Chow.<sup>45</sup>

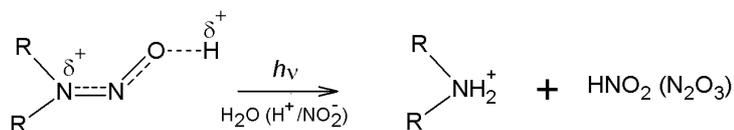
Baseado nessas informações e observações, Lee *et al.* propuseram duas rotas fotolíticas dependentes principalmente do pH e que produziriam espécies diferentes. Essas rotas foram classificadas como processos de clivagem homolítica e heterolítica, apresentadas nas Figuras 6 e 7.

- 1) Clivagem homolítica da ligação N-NO:



**Figura 6 – Clivagem homolítica da ligação N-NO de uma N-nitrosamina por radiação UV.**

- 2) Clivagem heterolítica da ligação N-NO:



**Figura 7 – Clivagem heterolítica da ligação N-NO de uma N-nitrosamina por radiação UV.**

De acordo com Lee *et al.*, a clivagem homolítica é termodinamicamente mais favorável que a heterolítica, porém esta é facilitada pelo ataque nucleofílico de uma molécula de água sobre o grupo nitroso da molécula da N-nitrosamina em solução

aquosa. Enquanto a clivagem heterolítica produz uma amina e o íon nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), a homolítica produz os respectivos radicais amíno e óxido nítrico. O radical  $\text{NO}^\bullet$ , por sua vez, é rapidamente oxidado a  $\text{NO}_2^-$  em meio aquoso.<sup>32</sup>

Considerando os mecanismos de fotoderivatização, observa-se a clara possibilidade de aplicação analítica ao se promover a reação dos íons nitrito gerados com o Reagente de Griess, possibilitando assim a determinação de NNG de maneira indireta.

Tendo em visto o objetivo de automatizar os procedimentos da derivatização fotoquímica seguida da reação de Griess, é conveniente que estes estejam arranjados em um sistema de análise por injeção em fluxo - FIA. Embora seja possível encontrar esta estratégia em publicações de diversas aplicações, não há nenhum registro de métodos para determinação de NNG em FIA, e menos ainda utilizando fotoderivatização.

O conhecimento dos trabalhos anteriores, mesmo de aplicação não específica ao NNG, foi de fundamental importância para pavimentar o caminho do delineamento das etapas para o propósito de um método analítico alternativo e automatizado.

## **2.5. Automatização do método para determinação de NNG**

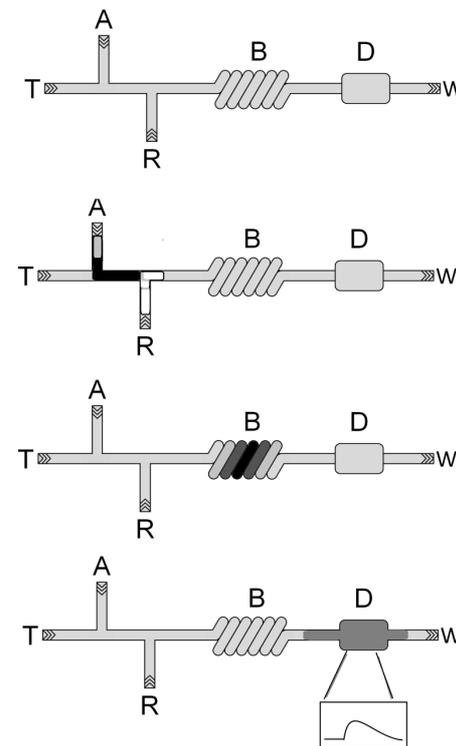
O presente trabalho buscou automatizar o procedimento de determinação de NNG por meio do acoplamento da etapa de fotoderivatização a um sistema de análise por injeção em fluxo – FIA com posterior detecção fotométrica baseada na reação de Griess.

A estratégia FIA consiste na realização das etapas analíticas de maneira subsequente em linha, isto é, preparo da amostra, diluição, extração, clean-up, reações e detecção são feitas uma após outra no mesmo fluxo controlado. Os sistemas FIA consolidados e mais utilizados atualmente têm suas origens na década de 1970, com o pioneirismo de Jaromir Ružička, Elo Hansen e a equipe de pesquisadores do Centro de

Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, especialmente Elias A. G. Zagatto e Henrique Bergamin Filho.

Conforme definição dada pelos próprios Ružička e Hansen, a análise por injeção em fluxo baseia-se na *“injeção de uma amostra líquida em uma solução transportadora em movimento e não segmentada de um líquido adequado. A amostra injetada forma uma zona que é então transportada a um detector o qual registra continuamente a absorvância, potencial elétrico, ou qualquer outro parâmetro físico, na medida em que altere-se continuamente como resultado da passagem do material da amostra através da cela de fluxo”*. Outra definição da técnica proposta pelos mesmos autores, porém trazendo uma ênfase diferente, é a *“coleta de informações de um gradiente de concentração formado a partir de uma zona bem definida de fluido injetado e disperso em um curso carreador contínuo e não-segmentado”*.<sup>46</sup>

Esta técnica vem ganhando popularidade ao longo dos anos, inclusive no campo das análises de pesticidas em geral, como por exemplo: determinação de Carbaril, Carbofurano, Propoxur e Isoprocarbe em águas, ditiocarbamatos em amostras sólidas<sup>47</sup> e Diclorvós em pimentão,<sup>48</sup> apenas para citar alguns. A determinação de N-nitrosaminas em água por FIA com reação de Griess também já foi relatada.<sup>49</sup> Como vantagens desse procedimento, podemos apontar o menor consumo de reagentes, solventes e da própria amostra; maior rapidez no processo analítico; minimização de erro aleatório no processo; menor intervenção humana; maior reprodutibilidade.<sup>50</sup> A Figura 8 mostra esquematicamente um sistema de análises em fluxo simplificado, em que as etapas se processam sequencialmente iniciando-se com a injeção da alíquota da amostra e da solução de um reagente no sistema. O fluido transportador tem o papel de carrear estas soluções até a bobina reacional para que ocorra mistura. Uma bomba peristáltica é responsável por impulsionar essas soluções pelo sistema até o detector, no qual ocorre a aquisição do sinal analítico.



**Figura 8 – Representação esquemática de um sistema de análise em fluxo simplificado.** A) Amostra, T) Transportador, R) Reagente, B) Bobina reacional, D) Detector e W) Descarte. Adaptado de Dias *et al.*<sup>51</sup>

O desenvolvimento dessa linha de pesquisa resultou em uma variedade de sistemas de análises, sendo alguns abordados neste projeto:

- **Multicomutação** - Sistema que emprega válvulas solenoides de 3 vias para direcionamento das soluções. Cada solução participante do sistema (amostra, reagente e transportador) tem sua injeção delimitada por uma válvula, cujo acionamento é controlado por um programa informatizado. Desta forma, pode-se estabelecer os volumes injetados de cada solução, considerando o tempo de abertura/fechamento dessas válvulas, a vazão da bomba e o diâmetro interno dos tubos. As injeções das soluções de amostra, reagente e transportador são feitas em momentos distintos, conforme aplicação prática e a critério do analista. Esta configuração de sistema proporciona facilidade de operação, reprodutibilidade pela minimização de intervenção humana e versatilidade pela possibilidade de variação dos parâmetros operacionais, em especial no que tange quantidades e momentos de mistura, além de permitir

acoplamento de dispositivos de preparo da amostra (SPE, lâmpadas UV, ultrassom, LLE, etc.). Esta estratégia é vantajosa para sistemas mais complexos, que contêm com maior número de etapas ou maior número de soluções participantes;

- **Monosegmentado** – a mistura entre amostra e reagente é delimitada entre dois segmentos de ar de tamanho controlado. O segmento de amostra preenche uma alça de amostragem, enquanto os fluxos de reagente e de ar seguem caminhos alheios a ela. No momento da injeção, segmentos de ar e de reagente são inseridos sequencialmente no caminho da alça de amostragem. A frente da zona de amostra faz interface com outro segmento de reagente e de ar, fazendo com que a mistura amostra-reagente seja delimitada por duas bolhas de ar controladas em um fluxo constante. Como vantagem deste sistema, a mistura é favorecida, já que dentro deste volume limitado a dispersão axial da solução não ocorre. Esta configuração é indicada para aplicações analíticas em que haja uma grande diferença de índices de refração entre as soluções da zona de amostra e do transportador, pois tais condições acabam por impor interferência à medida fotométrica do sinal transiente. Esta configuração também permite o acoplamento de dispositivos de tratamento da amostra e mantém a intervenção humana no processo analítico a um nível baixíssimo.

Estes dois sistemas serão considerados para o problema analítico abordado neste trabalho, qual seja, a automatização do método de determinação de NNG em amostras de Glifosato baseado em detecção fotométrica após reação com Reagente de Griess. Pretende-se montar um sistema considerando as etapas dos procedimentos existentes para determinação de NNG em amostras de produto técnico de Glifosato. A derivatização fotoquímica do NNG mostra-se como uma potencial alternativa ao procedimento convencional, o que permitirá eliminar etapas de aquecimento e reduzir o uso de ácidos em alta concentração, condições estas adversas à viabilização dos sistemas de análise por injeção em fluxo. Até o momento, não há na literatura científica, trabalhos envolvendo a determinação de NNG em Glifosato em sistemas de

análises em fluxo. Neste sentido, a elaboração de um método em FIA com determinação fotométrica, tendo em si acoplado o procedimento de derivatização fotoquímica do analito em questão, é oportuna e dá o caráter inovador à pesquisa e ao objetivo proposto.

## **2.6. Fotoderivatização associada a sistemas FIA como estratégias de automação**

A estratégia de utilizar etapa de fotoderivatização em um sistema de análise por injeção em fluxo pode ser observada na literatura em diversas aplicações, sendo as mais relevantes comentadas a seguir.

Lara *et al.*,<sup>52</sup> em um trabalho de revisão, apresentaram uma compilação de métodos de análise em fluxo com quimiluminescência fotoinduzida, elencadas conforme reagente utilizado. O princípio destes métodos era baseado na resposta do reagente luminescente, por exemplo, luminol, oxidado a partir de um produto da fotólise do analito de interesse sob radiação UV. O trabalho mostra que diferentes sistemas em fluxo podem acomodar lâmpadas UV, listando aplicações a diversos tipos de amostra e analito, desde contaminantes em águas até alimentos e formulações farmacêuticas. Boa parte destes sistemas utilizaram lâmpadas de mercúrio e de xenônio, e se basearam em FIA, multicomutação e em arranjos de colunas cromatográficas e reatores pós-coluna em linha. Os sistemas destacados no trabalho tinham em comum uma configuração em que se executava a fotólise da molécula mãe para posterior reação com agente luminescente, de maneira simples, rápida e sensível. Os trabalhos levantaram observações quanto a possíveis interferentes advindos de produtos paralelos da fotólise, os quais podem gerar resposta luminescente, requerendo, portanto tratamentos específicos.

Em trabalho de desenvolvimento de um método FIA para determinação espectrofotométrica do alcaloide emetina em amostras de urina, Benito *et al.*<sup>53</sup> utilizaram fotoderivatização. Uma bomba peristáltica era encarregada de transportar os fluidos, impulsionando uma solução de amostra e uma de ácido fosfórico até uma

câmara de mistura. Deste ponto, uma válvula controlava a injeção da mistura na bobina de PTFE de 265 cm enrolada em volta da lâmpada de mercúrio de 6 W. Foi demonstrado que o fluxo contínuo produzia ao final sinais muito mais intensos do que o fluxo interrompido por 30 ou 60 segundos, possivelmente em razão da dispersão do analito nesta situação, ou mesmo por sua degradação por excesso de radiação. O sistema apresentou reprodutibilidade em termos de RSD de 0,65 %, uma faixa linear de 0,05 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e frequência analítica de 67 amostras por hora, utilizando volume de amostra de 377  $\mu\text{L}$ .

Chen *et al.*<sup>54</sup> aplicaram um método FIA com fotoderivatização para determinação fluorimétrica de tiamina em preparações farmacêuticas e em soro humano. No sistema construído, as soluções da amostra e do reagente sulfito de sódio alcalino eram impulsionadas por uma bomba peristáltica para confluírem, sendo que a injeção da amostra era controlada por uma válvula. A mistura passava por uma bobina de PTFE enrolada em torno de uma lâmpada de mercúrio em fluxo contínuo, induzindo a resposta fluorescente. O método foi apresentado como uma evolução a um procedimento em batelada, ao eliminar a necessidade de acetona na sensibilização da molécula para a foto-reação, e possui como pontos positivos a faixa linear de trabalho de 0,01 a 10  $\text{mg L}^{-1}$ , RSD de 0,36 % e frequência analítica de 100 amostras por hora.

Em outra aplicação, David *et al.*<sup>55</sup> propuseram método em FIA para determinação de cloranfenicol em formulações farmacêuticas. O sistema consistia em uma montagem complexa com uma bomba peristáltica dedicada à injeção da amostra, a qual passava por uma bobina de PTFE de 750 cm enrolada em torno de uma lâmpada de mercúrio de 8 W. A injeção da amostra era controlada por uma válvula. Por outra bomba peristáltica, as demais soluções – transportador, luminol e nitrato de cobalto (II) – eram inseridas no sistema; os reagentes luminol e nitrato de cobalto (II) se misturavam em uma confluência, para posteriormente serem adicionados à amostra em outra confluência mais adiante e finalmente seguir até o detector. Este método pôde ser aplicado a outros compostos nitrosados, cujos produtos da fotólise eram capazes de oxidar luminol gerando uma resposta luminescente. O trabalho não investigou qual o fragmento da molécula de cloranfenicol é responsável por oxidar o luminol, apenas

sugerindo vagamente a possibilidade de se tratar de 4-nitrobenzaldeído. O método possui faixa linear de trabalho de  $2 \times 10^{-5}$  a  $5 \times 10^{-6}$  mol<sup>-1</sup> de cloranfenicol, reprodutibilidade com RSD de 1,8 % e frequência analítica de 60 amostras por hora.

Todos os sistemas estudados nesta revisão tinham em comum o fato de realizarem a foto-reação anteriormente à reação que gerará de fato a resposta analítica (nos casos citados, luminescente), além de dispor a bobina da foto-reação enrolada em redor da lâmpada, e manter o fluxo contínuo impulsionado por bomba peristáltica. Estes métodos demonstraram que o acoplamento de foto-reações em linha é perfeitamente factível, e produziram resultados positivos em termos de amplitude da faixa de trabalho, reprodutibilidade e frequência analítica.

Com abordagem semelhante, é possível observar alguns exemplos de aplicações da fotoderivatização de N-nitrosaminas em sistemas de análise em fluxo existentes na literatura.

A determinação de N-nitrosaminas em produtos cárneos explorada por Luque-Pérez *et al.*<sup>56</sup> se baseou em um fluxo controlado por duas bombas peristálticas, sendo a primeira responsável por encaminhar a amostra injetada através das etapas de filtragem e resfriamento até a câmara com radiação UV, e a segunda responsável por succionar a amostra derivatizada e direcioná-la ao encontro do reagente de Griess com uma válvula seletora e daí até o detector. A derivatização ocorria em um reservatório estático de quartzo, no qual a amostra permanecia irradiada por um tempo determinado dependendo da sensibilidade requerida (5, 10 ou 15 minutos) até ser bombeada novamente para dentro do fluxo, e a detecção era feita por um espectrofotômetro de arranjo de diodos. Este método possuía um arranjo operacional complexo, com grande número de etapas e itens caros.

Outro método com o mesmo objetivo foi apresentado por Pérez-Ruiz *et al.*<sup>57</sup> e se baseou na detecção por quimiluminescência. O sistema era constituído de dois foto-reatores, um para a derivatização de N-nitrosodimetilamina na amostra e o outro para oxidação do reagente Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> a Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>. Ambos utilizaram uma lâmpada UV de 40 W de potência. Dimetilamina (produto da fotoderivatização da amostra) e Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>

(produto da foto-oxidação do complexo reagente) confluíam para mistura gerando uma resposta quimiluminescente, monitorada sem qualquer discriminação do comprimento de onda com um luminômetro. Neste método, o nitrito oriundo da fotoderivatização do analito era retido em uma coluna de troca iônica antes da mistura, pois poderia interferir na reação observada. Além do fato de utilizar reagentes de alto custo, este método era consideravelmente sensível a mudanças de pH, exigindo 3 tampões diferentes.

Todos estes métodos possuem abordagem semelhante, isto é, proporcionaram a determinação da espécie de interesse por meio da quantificação do produto da reação entre o nitrito liberado e uma molécula que induzia a uma resposta analítica. Eles também demonstraram que é factível utilizar a etapa de derivatização na forma fotoquímica em um sistema FIA, tornando o procedimento mais simples. Um exemplo desta simplificação é o fato de tornar-se desnecessária a etapa de resfriamento presente em alguns dos sistemas mencionados anteriormente, já que a denitrosilação por foto-reação não requer aquecimento.

Para este projeto especificamente, propõe-se a alteração da etapa de derivatização química convencional que requer altas quantidades de ácido e um dispositivo de aquecimento, substituindo-as por uma simples lâmpada UV para realizar a retirada da espécie NO da molécula de NNG. Como mencionado, existem na literatura científica alguns métodos para determinação de N-nitrosaminas em diversas matrizes utilizando radiação na região do ultravioleta ao invés da adição de ácido e aquecimento para retirada do grupo nitroso, mas nenhum para determinação de NNG. Este procedimento, conhecido como fotoderivatização ou derivatização fotoquímica, é conveniente ao acoplamento a um sistema FIA pela sua facilidade de instalação, operação mais prática na corrida de análises, rapidez conferida ao processo, e por permitir economia de insumos para a realização do procedimento.

## **2.7. Objetivo**

O objetivo deste trabalho é desenvolver um método sensível, rápido e de baixo custo para a determinação fotométrica de NNG em amostras de produto técnico e formulações do ingrediente ativo Glifosato por meio de um sistema de análise por injeção em fluxo com fotoderivatização.

### ***3. Experimental***

### **3.4. Materiais**

A instrumentação e demais materiais utilizados ao longo do projeto são relacionados abaixo.

- A. Bomba peristáltica – marca ISMATEC, modelo C. P. 78001-12.
- B. Injetor proporcional multicomutador.
- C. Tubos de PTFE de 0,8 mm di.
- D. Cubeta de fluxo em quartzo, marca Hellma, vol. 80  $\mu$ L
- E. Lâmpada UV – marca SYLVANIA, modelo GCF11DS/G23/SE/OF.
- F. LED (diodo emissor de luz) cor verde, 540 nm, 5 mm diâmetro.
- G. Fotodiodo OPT-101.
- H. Interface analógico-digital National Instruments – NI USB 6009.
- I. Cartucho SPE - Phenomenex Strata SAX
- J. Espectrofotômetro Agilent – 8453 UV-Vis, com cubeta de quartzo 10 mm, vol. 3,0 mL.

### **3.5. Reagentes e Soluções**

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e as soluções preparadas com água ultrapura. Abaixo são descritas as soluções utilizadas para o desenvolvimento do trabalho.

- A. Solução estoque de NNG na concentração  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , preparada a partir da dissolução do padrão em pó fornecido por Monsanto Inc. (padrão analítico 100 %). As soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições desta solução estoque com água deionizada. As soluções devem ser mantidas em frasco âmbar, protegidos da luz para evitar a fotodegradação do NNG;

- B. Soluções estoque de Glifosato nas concentrações  $20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ , preparadas a partir do padrão em pó fornecido por Monsanto Inc. (padrão analítico 99,8%). As soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições destas soluções estoque com água deionizada, conforme o propósito;
- C. Solução de NED/SAM preparada a partir dos reagentes em pó Sulfanilamida – SAM (marca Synth, 100 %) e N-(1-Naftiletilenodiamino) Biclórídrico – NED (marca Vetec,  $\geq 98,0 \%$ ), e de ácido clorídrico concentrado (marca ECIBRA Analíticos, 36,5 - 38,0 %). A solução foi preparada da seguinte forma: pesou-se 0,7 g de SAM em um béquer de 100,0 mL, ao qual foram adicionados cerca de 80,0 mL de água deionizada e 1,0 mL de HCl concentrado. Agitou-se vigorosamente até a completa dissolução da SAM. Foram então adicionados 0,1 g de NED, misturando e completando o volume com água deionizada até 100,0 mL em um balão volumétrico. Desta solução, 10 mL foram diluídos com 30 mL de água deionizada. A solução tem vida útil de cerca de 3 semanas, se armazenada devidamente em frasco âmbar fechado, protegida da luz e preferencialmente em geladeira. Caso sua coloração venha a ganhar um tom marrom mais intenso com o passar do tempo, é necessário descartá-la e preparar uma nova, sob risco de interferência na análise;
- D. Solução estoque de  $\text{NO}_2^-$  na concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , preparada a partir da dissolução de 0,345 g de  $\text{NaNO}_2$  (marca SIGMA ALDRICH,  $\geq 97,0 \%$ ) em 100 mL de água deionizada. Desta solução, foram retirados 10  $\mu\text{L}$  com uma micropipeta de volume 10-100 $\mu\text{L}$  e diluídos em 100 mL de água deionizada, para se alcançar a concentração desejada de  $0,345 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_2$ ;
- E. Fase sólida – fase sólida de amônio quaternário para troca aniônica, retirada de cartuchos SPE Strata SAX (marca Phenomenex);
- F. Amostras de Produtos técnicos sólidos fornecidos por Monsanto Inc. e Bioagri Laboratórios Ltda.; e amostras de formulados líquidos fornecidos por Monsanto Inc.

### **3.6. Métodos**

O princípio do método é baseado na detecção espectrofotométrica de um composto azo colorido, produto da reação da solução NED/SAM com íons  $\text{NO}_2^-$ , sendo esta etapa conhecida como Reação de Griess. Os íons  $\text{NO}_2^-$  em questão são gerados pela clivagem da ligação N-NO do NNG. É nesta clivagem que consiste a derivatização propriamente dita, e que foi explorada conforme experimentos descritos a seguir.

#### **3.6.1. Derivatização do NNG**

O grupo nitroso retirado da molécula de NNG é a espécie que participa da reação de Griess. Trata-se, portanto, de uma determinação indireta do analito de interesse, em que é necessário submetê-lo a condições tais que removam de sua estrutura a espécie nitrito como primeira etapa do processo reacional, para então dar seguimento às reações de diazotação e acoplamento descritas na Figura 3, item 2.3.

Os experimentos descritos a seguir foram realizados em batelada.

##### **3.6.1.1. Derivatização Química**

Para estudo da derivatização química comumente utilizada na determinação de NNG, foi escolhido inicialmente o procedimento proposto por Kim *et al.*, o qual utiliza ácido mineral em concentração relativamente alta, e requer aquecimento. A princípio, o mecanismo desta etapa consiste na protonação do grupo nitroso da molécula, favorecendo a clivagem da ligação N-NO pelo aquecimento.

Primeiramente, foram feitos testes em batelada para tomada de conhecimento do processo e verificação das condições experimentais apresentadas no método. Assim, soluções de NNG em água deionizada em diferentes concentrações produzidas a partir da solução estoque foram submetidas a derivatização em presença de HCl a  $4,5 \text{ mol L}^{-1}$  e sob aquecimento a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por um período de 15 minutos. Ao final, foi adicionada à mistura a solução de NED/SAM, para detecção por espectrofotometria.

Foi investigada a eficiência da derivatização comparando-se os sinais analíticos obtidos da solução padrão de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  submetido ao procedimento e os sinais da solução padrão de  $\text{NO}_2^-$  a  $0,345 \text{ mg L}^{-1}$  (concentração correspondente à completa conversão de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de NNG em  $\text{NO}_2^-$ ), reagindo com a mesma solução de reagentes de Griess.

Todos os experimentos foram feitos em triplicatas e as soluções analisadas espectrofotometricamente.

### **3.6.1.2. Experimentos com reagentes alternativos para a denitrosilação**

Ainda buscando alternativas à derivatização química convencional, foram realizados testes com reagentes alternativos que procederiam a mecanismo semelhante para a clivagem da ligação N-NO na molécula de NNG, mais especificamente o Dimetilsulfato (DMS) como reagente alquilante. A princípio, a alquilação no sítio amina da molécula de NNG favoreceria a liberação do grupo NO, semelhantemente ao que é promovido pela protonação, porém prescindindo de adição de ácido e aquecimento. O DMS, no entanto, hidrolisa em presença de água ou demais solventes próticos, tornando necessário mudar o solvente para o trabalho com as soluções de NNG, Glifosato e NED/SAM. Foi testada a solubilidade dessas substâncias nos solventes Tolueno,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Acetonitrila e DMSO.

Posteriormente, solução padrão de NNG a  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  com gotas de DMS foram misturadas à solução de NED/SAM a fim de verificar a ocorrência da derivatização por meio da reação de Griess.

Todas as reações foram feitas à temperatura ambiente, sem adição de ácido. Após essa etapa, todas foram analisadas espectrofotometricamente.

### **3.6.1.3. Derivatização Fotoquímica**

Buscou-se na derivatização fotoquímica, ou fotoderivatização, uma solução para o obstáculo imposto pela etapa de aquecimento prevista nos métodos convencionais, de maneira a viabilizar a montagem de um sistema FIA eficiente. Por esta proposta, o processo reacional se torna mais propício a uma futura montagem de sistema de análise em fluxo.

Todo o aparato para a fotoderivatização foi montado no interior de uma caixa de madeira com tampa, vedando-se ou anteparando-se quaisquer orifícios pelos quais a radiação pudesse sair, para proteção do usuário. Lâmpadas UV de diferentes potências foram testadas neste sistema. Uma ventoinha foi instalada na lateral da caixa para prevenir o eventual aquecimento da lâmpada.

Para estimar a eficiência da foto-reação, foram comparadas as absorvâncias em comprimento de onda 540 nm obtidas da solução de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  com uma solução de  $\text{NO}_2^-$  a  $0,345 \text{ mg L}^{-1}$ . Béqueres com as soluções foram colocados dentro do foto-reator, expostos à radiação UV por intervalos de 5, 10 e 15 minutos.

Os principais parâmetros que governam a foto-reação, isto é, a potência da lâmpada utilizada e o tempo de exposição, foram investigados.

#### **3.6.1.3.1. Potência da lâmpada UV**

Para efeitos de comparação com o procedimento de derivatização ácida convencional, soluções de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram expostas às lâmpadas de diferentes potências:

- I. Lâmpada de 4 W) A solução de NNG foi exposta por diferentes intervalos de tempo: 15, 30, 60, 90 e 120 segundos. O pH da solução foi acidificado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10 % e HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Após a exposição, foi feita mistura com a solução de NED/SAM, a fim de verificar a formação de produto.

- II. Lâmpada de 125 W) Foi retirado o bulbo responsável por filtrar os raios UV de uma lâmpada de mercúrio de 125 W. A solução de NNG em pH próximo de neutro foi exposta a esta lâmpada por 60 segundos, e posteriormente foi adicionada solução de NED/SAM, a fim de verificar a formação de produto.
- III. Lâmpada de 11 W) A solução de NNG em pH próximo de neutro foi exposta a esta lâmpada por 5 minutos, e posteriormente foi adicionada solução de NED/SAM, a fim de verificar a formação de produto.

#### **3.6.1.3.2. Tempo de exposição**

Um béquer contendo NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  foi deixado exposto à radiação UV de uma lâmpada de 11 W por diferentes períodos de tempo: 30 segundos, 5, 10 e 15 minutos. Este foi o maior tempo testado pelo fato de ser o tempo utilizado no procedimento de derivatização convencional. Após os respectivos períodos foi adicionado 1,0 mL da solução de NED/SAM a cada um dos frascos, e os produtos analisados espectrofotometricamente. Os experimentos foram feitos em triplicata.

#### **3.6.2. Sistemas de análise por injeção em fluxo**

O sistema de análise em fluxo foi desenvolvido de modo a permitir a realização em linha das etapas de amostragem, fotoderivatização, reação de Griess e detecção, com controle de etapas e coleta de dados sendo realizados por meio de um programa computadorizado elaborado no próprio laboratório.

Nos itens a seguir são descritos o desenvolvimento do programa, a construção do dispositivo de detecção e a montagem das diferentes configurações de FIA colocadas em teste.

### **3.6.2.1. Desenvolvimento do programa computacional para controle das válvulas e aquisição de sinal analítico**

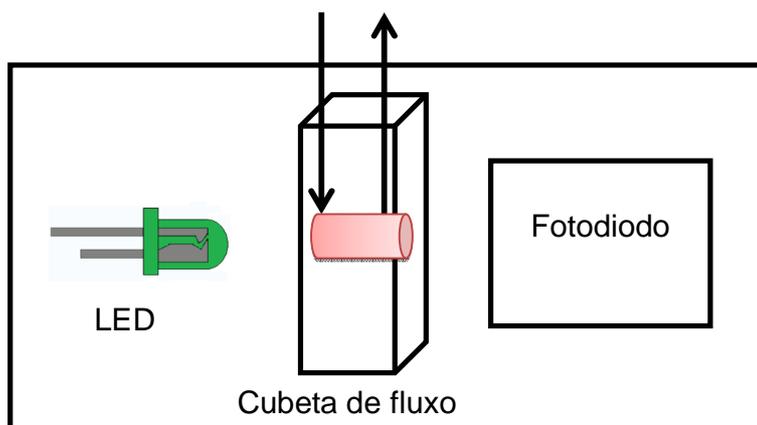
A interface de usuário foi construída na linguagem de programação Visual Basic, no ambiente do software Microsoft Visual Studio 6.0.<sup>58</sup> A função do programa era enviar comandos de abertura/fechamento das válvulas e receber as variações em intensidade de radiação na forma de sinal elétrico. A ferramenta foi então delineada de maneira que o usuário pudesse, por meio de comandos simples, controlar as válvulas dedicadas ao direcionamento das soluções de transportador e de amostra dentro do sistema em fluxo pelo tempo considerado necessário para execução da fotoderivatização e da reação de Griess.

Assim, o código do programa foi escrito de maneira que permitisse a operacionalização das válvulas em etapas, utilizadas a critério do analista, e a visualização em tempo real do sinal elétrico transmitido.

### **3.6.2.2. Construção do detector fotométrico baseado em LED**

O dispositivo fotométrico foi desenvolvido por A. Fonseca, e era constituído originalmente de um LED de cor vermelha e um fotodiodo como detector das variações de intensidade de luz.<sup>59</sup> O dispositivo permite o encaixe de uma cubeta construída para análises fotométricas em fluxo, com caminho óptico de 1 cm.

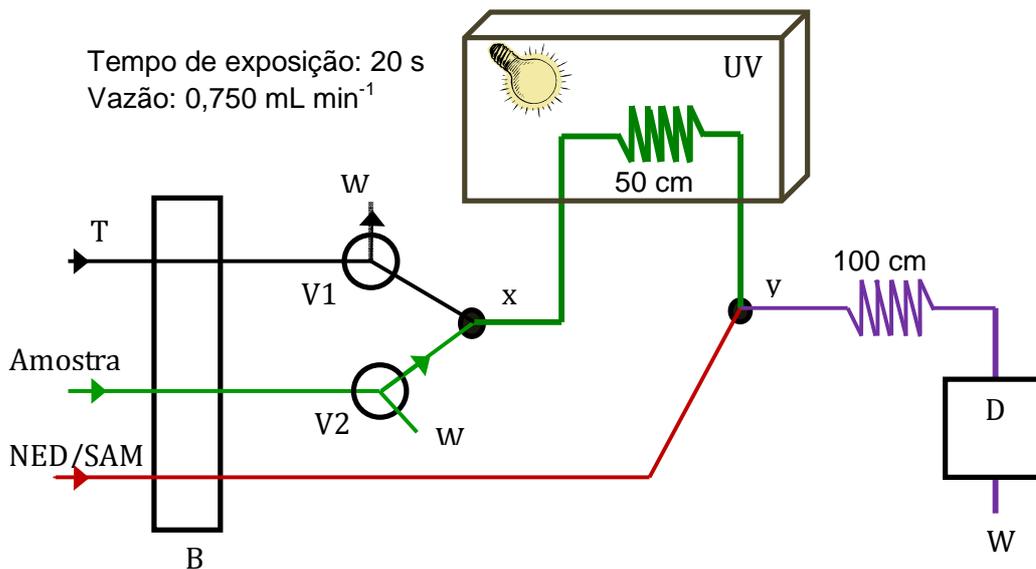
O produto da reação de Griess, que é a espécie de interesse na determinação concebida neste projeto, é um cromóforo que possui máximo de absorção no comprimento de onda 540 nm. Para uma detecção específica desta molécula, o dispositivo foi adaptado de modo a acomodar um LED de cor verde, cuja faixa de comprimento de onda emitida é em torno de 540 nm. Desta forma foi possível avaliar a quantidade de radiação absorvida pelo cromóforo, uma vez que o fotodiodo atua como um transdutor, convertendo a radiação em sinal elétrico. A Figura 9 apresenta esquematicamente o dispositivo com seus componentes principais.



**Figura 9 – Representação esquemática do dispositivo de detecção.**

### **3.6.2.3. Sistema de análise em fluxo por multicomutação com fotoderivatização**

O sistema foi composto de duas válvulas solenoides V1 e V2 que executavam a injeção das soluções de transportador e de amostra, respectivamente, conforme descrito esquematicamente na Figura 10. Ambas as soluções eram impulsionadas por uma bomba peristáltica à vazão de  $0,750 \text{ mL min}^{-1}$ , em direção à bobina de PTFE de 50 cm enrolada sobre a lâmpada UV no interior do foto-reator. Quando do acionamento das válvulas pelo período de 20 segundos,  $250 \mu\text{L}$  de amostra eram introduzidos no sistema. Em uma confluência após a foto-reação, a zona de amostra se encontrava com a solução de NED/SAM que era bombeada continuamente na mesma vazão. As soluções se misturavam em uma bobina reacional de 100 cm e se encaminhavam ao detector para coleta dos dados analíticos. O fluxo não foi interrompido em nenhum momento.



**Figura 10 – Representação esquemática do sistema de análise por injeção em fluxo baseado em multicomutação.** B) Bomba peristáltica, T) Transportador (água deionizada), V1 e V2) Válvulas solenoides, x e y) confluências, UV) Foto-reator (com lâmpada de 11 W), D) Detector e W) descarte.

Com este sistema, foram empreendidos testes de otimização da reação de Griess e demais experimentos da determinação em questão.

### 3.6.2.3.1. Otimização da reação de Griess

A reação de Griess consiste resumidamente na formação de uma molécula de sal de diazônio a partir da Sulfanilamida provocada pela espécie  $\text{NO}_2^-$ , a qual por sua vez reage rapidamente com N-(1-naftiletilenodiamino) (Figura 3). O produto final é um composto de coloração rosa, contendo um cromóforo com absorção característica em comprimento de onda 540 nm.<sup>60</sup> A primeira etapa, referida como diazotação, é favorecida em meio ácido (pH ~ 1). A forma de utilização destes reagentes diverge entre as referências estudadas, bem como suas composições. A Tabela 1 apresenta 3 condições encontradas na literatura, que diferem entre si quanto à proporção de NED em relação a SAM e o ácido utilizado.

**Tabela 1 – Descrição resumida das diferentes composições do reagente de Griess.**

	<b>Condição 1</b> <sup>61</sup>	<b>Condição 2</b> <sup>62</sup>	<b>Condição 3</b> <sup>63</sup>
<b>NED</b>	0,1 g	0,1 g	0,1 g
<b>SAM</b>	1,0 g	4,0 g	2,0 g
<b>Ácido</b>	HCl (10,0 mL)	HCl (10,0 mL)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (8,0 mL)

Estes reagentes tiveram suas respostas avaliadas em medidas fotométricas realizadas por meio do sistema baseado em multicomutação descrito no item 3.3.2.3. Nestes experimentos não havia necessidade de se ligar a lâmpada UV. Foram investigados não só os sinais analíticos obtidos com solução padrão de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, como também a resposta do branco gerada por cada uma dessas condições. O experimento constituiu-se das etapas abaixo, seguidas para cada condição da Tabela 1:

- I. Primeiramente, utilizando os reagentes na concentração conforme modo de preparo das respectivas referências, foi feita análise do branco no sistema em fluxo;
- II. Posteriormente, foi feita análise com solução padrão de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a 0,15 mg L<sup>-1</sup> no lugar da amostra;
- III. Foi feita a diluição de cada um dos reagentes preparados, em que foram retirados 5 mL de cada solução e transferidos para balões volumétricos de 50 mL, com o volume completado com água deionizada. Foi feita leitura do branco dessas soluções;

Foi feita análise de uma solução padrão de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a 0,15 mg L<sup>-1</sup> com os reagentes diluídos.

Após os experimentos com solução padrão de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, passou-se aos experimentos de fotoderivatização do NNG.

### **3.6.2.3.2. Estudo dos parâmetros do método no sistema multicomutação**

Com o sistema apresentado no item 3.3.2.3, foram feitos estudos de relação sinal/ruído e construída uma curva analítica com soluções padrão de NNG em 5 concentrações:  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ .

Posteriormente, diante dos experimentos realizados, foi estabelecido o funcionamento e o procedimento do método.

### **3.6.2.3.3. Procedimento analítico**

- Iniciou-se a vazão da bomba peristáltica a  $0,750 \text{ mL min}^{-1}$ , com cada solução em seu respectivo canal, conforme esquematizado na Figura 9;
- Foram acionadas as válvulas V1 e V2 simultaneamente por 20 segundos, com a lâmpada UV ligada e a caixa fechada;
- A zona de amostra ( $250 \mu\text{L}$ ) foi introduzida no foto-reator, preenchendo a bobina de 50 cm em torno da lâmpada;
- As válvulas de V1 e V2 voltaram ao estado inicial, interrompendo a injeção de amostra e fazendo com que o fluido transportador empurrasse a zona de amostra ao longo da bobina de foto-reação em direção à confluência;
- Na confluência após o foto-reator, a zona de amostra, agora derivatizada, encontrou-se com a solução de NED/SAM, misturando-se em uma bobina reacional de 100 cm;
- A mistura seguiu para o detector, onde se deu a coleta do sinal analítico.

Este procedimento foi aplicado também para os testes com amostras reais.

#### 3.6.2.3.4. Testes com amostras reais

Para o preparo das amostras de produto técnico de glifosato, foi utilizado o procedimento descrito pelo método de referência, a saber, Monsanto AQC 684-86:<sup>35</sup> foram pesados 0,4 g de amostra de produto técnico de glifosato ácido em um béquer, e adicionados 0,85 mL de solução de NaOH 2,5 mol L<sup>-1</sup> com 0,3 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O volume foi completado a 10,0 mL com água deionizada. Esta suspensão foi filtrada em papel de filtro comum e injetada no sistema.

Outra amostra foi preparada da mesma maneira, porém com fortificação de NNG a 1,0 mg L<sup>-1</sup>, a fim de verificar a eficiência de extração deste procedimento. As análises foram então realizadas conforme procedimento descrito no item 3.3.2.3.3.

Procurou-se tratar a amostra durante seu preparo com vistas à redução do efeito Schlieren. Assim, foram feitas análises de amostras com as seguintes adições posteriores ao preparo descrito acima:

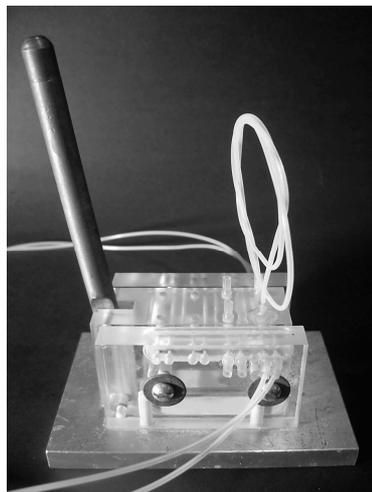
- Adição de 1 gota de HCl concentrado;
- Adição de 3 gotas de HCl concentrado;
- Adição de 1,0 mL de HCl a 0,21 mol L<sup>-1</sup>;
- Adição de 5 gotas de HCl concentrado;
- Adição de 2,2 mL de HCl a 1,0 mol L<sup>-1</sup>;

Nas amostras fortificadas com NNG, foram analisados os seguintes tratamentos após o preparo:

- Adição de 5 gotas de HCl concentrado;
- Adição de 2,2 mL de HCl a 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

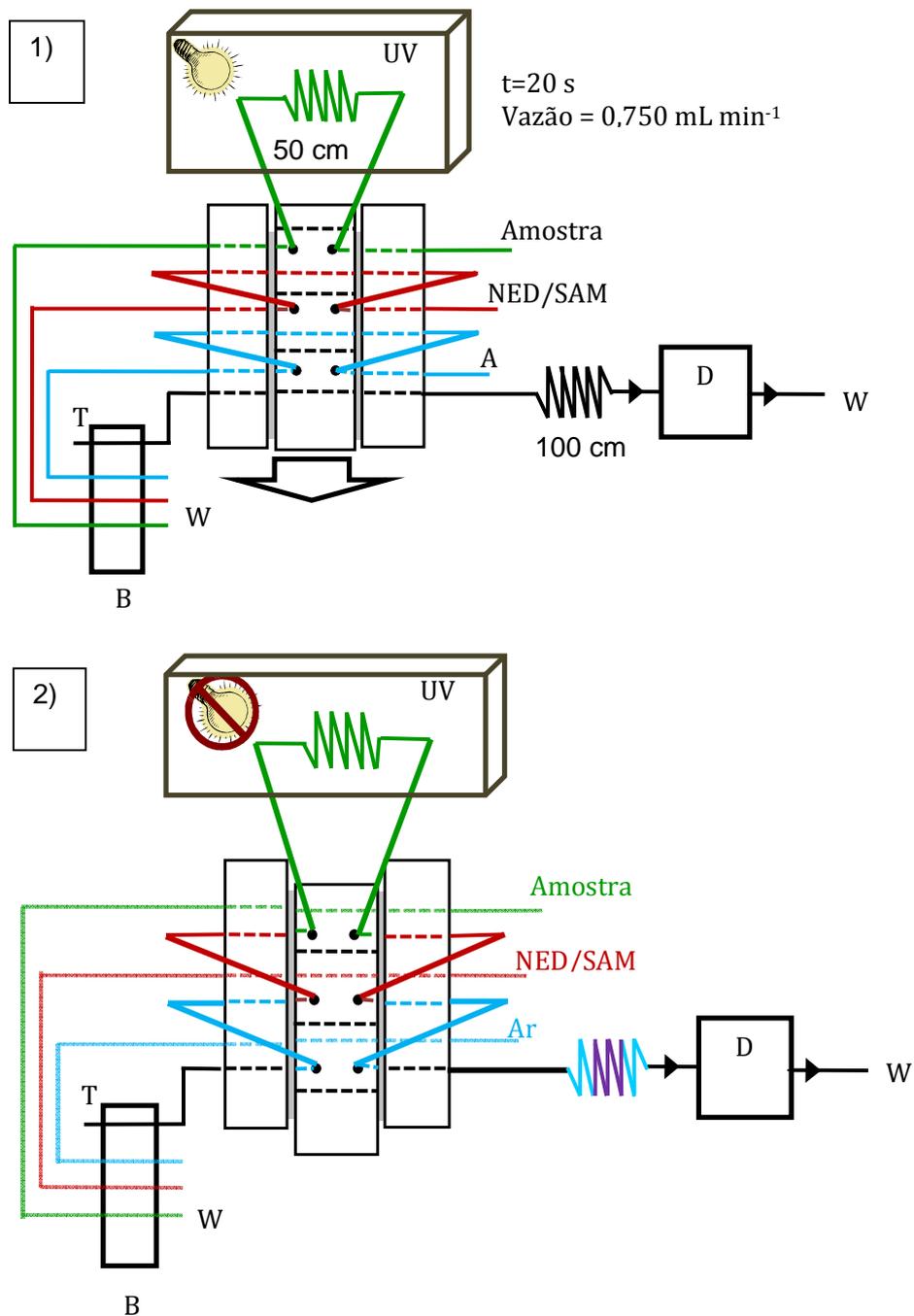
#### 3.6.2.4. Sistema de fluxo monosegmentado com fotoderivatização

O arranjo de válvulas foi substituído por um injetor comutador, conforme ilustrado na Figura 11.



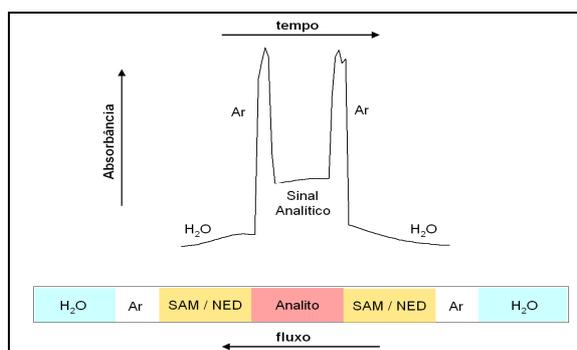
**Figura 11 – Injetor comutador**, com alavanca para mudança de posição, alça de amostragem de PTFE e entradas e saídas de fluxo. Adaptado de Dias *et al.*<sup>51</sup>

A bomba peristáltica impulsionava o ar ambiente e as soluções de amostra, reagente e transportador por seus respectivos canais no injetor comutador na vazão de  $0,750 \text{ mL min}^{-1}$ . Na posição de amostragem, a solução da amostra era mantida fluindo pela bobina de PTFE de 50 cm sobre a lâmpada UV no interior do foto-reator, preenchendo posteriormente a alça de amostragem de  $250 \mu\text{L}$ . Acionada a posição de injeção, a parte móvel do injetor conecta os canais conforme as linhas pontilhadas na figura. Isto é, o fluxo do transportador é inserido no canal do segmento de ar, impulsionando-o. Este, por sua vez, impulsionado pelo segmento de ar, é inserido no canal da solução de NED/SAM, que então impulsiona a solução da amostra contida na alça de amostragem. Em sequência, segmentos de NED/SAM e ar são impulsionados por todo este conjunto de soluções. Como resultado, obtém-se uma zona de amostra composta dos segmentos NED/SAM – amostra – NED/SAM, delimitados em ambas as extremidades por bolhas de ar de tamanho controlado, conforme ilustrado na Figura 12. Toda esta sequência segue pela bobina reacional de 100 cm visando favorecer a mistura e por fim ao detector.



**Figura 12 – Representação esquemática do sistema de análise em fluxo monosegmentado.** 1) Posição de amostragem; 2) Posição de injeção; B) Bomba peristáltica, T) Transportador (água deionizada), UV) Foto-reator, D) Detector e W) descarte. As linhas tracejadas representam os canais no interior do injetor; as linhas sólidas correspondem às alças de tubos de PTFE externas. A seta indica o movimento da peça interna do injetor entre as posições de amostragem e injeção.

A Figura 13 mostra claramente como se constitui a zona de amostra neste sistema e o formato do sinal analítico resultante deste arranjo. Observa-se que o sinal obtido da espécie sob análise aparece na detecção fotométrica entre dois picos de bolhas de ar.



**Figura 13 – Registro do sinal analítico e formação da zona de amostra produzida pelo sistema monosegmentado.**

O desempenho deste sistema foi avaliado com soluções padrão de NNG. Posteriormente, estabelecido o procedimento analítico a ser seguido, foram experimentadas amostras de produto técnico sólido de glifosato.

#### **3.6.2.4.1. Estudo dos parâmetros do método por sistema de fluxo monosegmentado**

Com o sistema descrito no item 3.3.2.4, soluções padrão de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram utilizadas para testar a eficiência do método e obter o registro do sinal analítico. Foi então construída uma curva de calibração com soluções padrão de NNG nas concentrações  $0,20$ ,  $0,60$  e  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ . As leituras foram feitas em duplicata.

Posteriormente, diante dos experimentos realizados, foi estabelecido o funcionamento e o procedimento do método.

#### **3.6.2.4.2. Procedimento analítico**

- Iniciou-se a vazão da bomba peristáltica a  $0,750 \text{ mL min}^{-1}$ , com cada solução em seu respectivo canal, conforme esquematizado na Figura 10, mantendo-se o injetor na posição de amostragem e com a lâmpada UV ligada;

- A amostra preencheu a alça de amostragem de 50 cm enrolada sobre a lâmpada dentro do foto-reator, quando então altera-se a posição para injeção e desliga-se a lâmpada UV;
- Na posição de injeção, o segmento de ar impulsiona o segmento de NED/SAM, que por sua vez impulsiona a seção de amostra contida na alça de amostragem que está no foto-reator. Este volume de amostra impulsiona outro segmento de NED/SAM, que impulsiona outro segmento de ar;
- Os segmentos Ar – NED/SAM – Amostra – NED/SAM – Ar passam por uma bobina de 100 cm para favorecer a mistura entre amostra derivatizada e reagentes, e direcionam-se ao detector, onde ocorre a coleta do sinal analítico.

Este procedimento foi aplicado também para os testes com amostras.

#### **3.6.2.4.3. Testes com amostras reais**

Objetivando alcançar resultados livres de interferências originadas do preparo, o procedimento de extração foi substituído por um mais proposto por Bioagri Laboratórios.<sup>64</sup> Conforme este procedimento, foram pesados 1,5 g de amostra de produto técnico glifosato ácido em um béquer, e adicionados 5,0 mL de água deionizada. A suspensão foi submetida a ultrassom por 5 minutos, sendo posteriormente filtrada em papel de filtro comum. A solução filtrada foi então inserida no sistema em fluxo. Paralelamente, em outra amostra, foi feita uma fortificação com NNG a 1,0 mg L<sup>-1</sup> antes da etapa do ultrassom.

As análises foram então realizadas conforme procedimento descrito no item 3.3.2.4.2.

#### 3.6.2.4.4. Estudo de interferência da matriz

Em testes em batelada, foi investigada a possível interferência do principal componente da matriz sobre o analito em questão, isto é, glifosato em alta concentração. A hipótese é que sua presença possa interferir na reação capturando os íons NO retirados da molécula de NNG. O mecanismo do que seria a nitroação da molécula de glifosato já foi amplamente estudado, sendo proposto como uma técnica de determinação indireta de seu teor.<sup>27</sup>

Misturas das soluções padrão de  $\text{NO}_2^-$  a  $0,345 \text{ mg L}^{-1}$  com glifosato a  $2.000 \text{ mg L}^{-1}$  foram submetidas à reação de Griess e analisadas espectrofotometricamente, comparando-se os espectros com aqueles obtidos a partir da solução padrão de  $\text{NO}_2^-$  sem glifosato.

Posteriormente, soluções padrão de NNG em diferentes concentrações foram misturadas com glifosato, de maneira a se obter amostras com as seguintes proporções entre NNG e glifosato:

- 1:1 – NNG a  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e glifosato idem;
- 1:10 – NNG a  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e glifosato a  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;
- 1:100 – NNG a  $0,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e glifosato a  $20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;
- 1:1000 – NNG a  $0,02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e glifosato a  $20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;

Cada uma dessas misturas foi submetida ao procedimento de derivatização química, adicionando-se HCl a  $4,5 \text{ mol L}^{-1}$  e NED/SAM, e aquecendo-se a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Os produtos das reações foram analisados espectrofotometricamente, comparando-se com produtos de reações de NNG nas mesmas concentrações, porém sem adição de glifosato.

A possível interferência do glifosato foi verificada também no método de derivatização fotoquímica. Uma solução padrão de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  misturada com glifosato a  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  em um béquer foi exposta à radiação UV de uma lâmpada de 11 W por 30 segundos, e posteriormente foi adicionada solução de NED/SAM. O produto foi analisado espectrofotometricamente, comparando-se com o produto obtido de uma solução de NNG na mesma concentração, porém sem adição de glifosato.

### 3.6.2.5. Experimentos com SPE simultâneo à fotoderivatização

O princípio utilizado nesta abordagem foi a retenção dos íons nitrosil e nitrito oriundos da fotoderivatização em uma coluna de troca aniônica forte. Esta estratégia é mencionada por Kim *et al.* e outros autores como uma etapa de *clean-up* da amostra objetivando impedir que íons nitrito de outras fontes que não o analito derivatizado venham a participar da reação de Griess, sendo assim contabilizados como se fossem da espécie de interesse da determinação. Propôs-se aplicar esta ferramenta de retenção para a espécie de interesse, isto é, íons nitrito oriundos da fotoderivatização do NNG.

Os testes de extração em fase sólida simultânea à fotoderivatização foram realizados em batelada e objetivaram obter maior eficiência do processo pela eliminação do tempo de residência entre a denitrosilação e a adição de NED/SAM, prevendo-se acoplamento a um sistema de análise em fluxo.

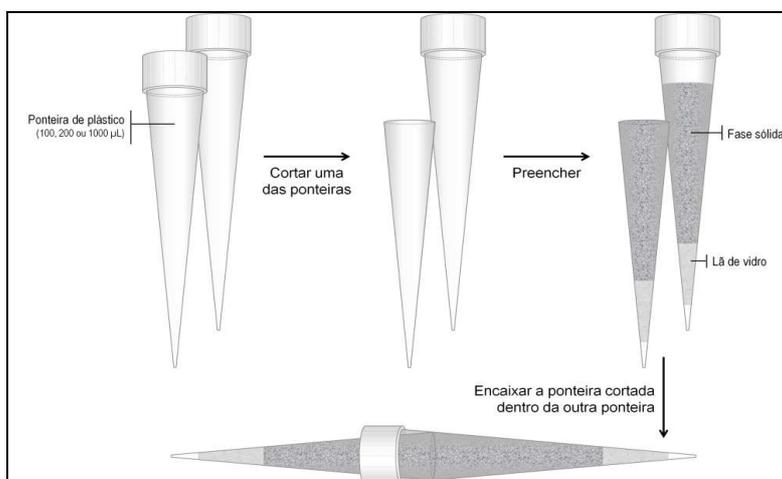
O cartucho de extração em fase sólida foi condicionado com uma solução de 450  $\mu\text{L}$  de acetonitrila e 5 mL de água deionizada. Uma solução padrão de NNG a 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  foi inserida no cartucho, sem percolar, estando este dentro do foto-reator exposto à radiação UV da lâmpada de 11 W por 5 minutos. A solução da amostra então foi succionada com o auxílio de uma bomba peristáltica em vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . A lâmpada foi então desligada e 2,0 mL da solução de NED/SAM foram adicionados, como eluente succionado pela bomba peristáltica na vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Tanto a solução da amostra como o eluato foram recolhidos em béqueres. À solução da amostra foi adicionada solução de NED/SAM para verificar a formação de produto.

Em procedimento idêntico, uma solução de NNG a 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  misturada a glifosato a 2000  $\text{mg L}^{-1}$  foi submetida à extração com a lâmpada UV ligada por 5 minutos. A solução percolou a coluna a uma vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , e em seguida foi misturada a uma solução de dimetilaminocinamaldeído (p-DAC) preparada conforme referência para determinação de glifosato.<sup>65</sup> Com a lâmpada desligada, foi adicionado NED/SAM ao cartucho para eluição na mesma vazão.

Foi então preparada uma coluna de SPE para acoplamento em linha.

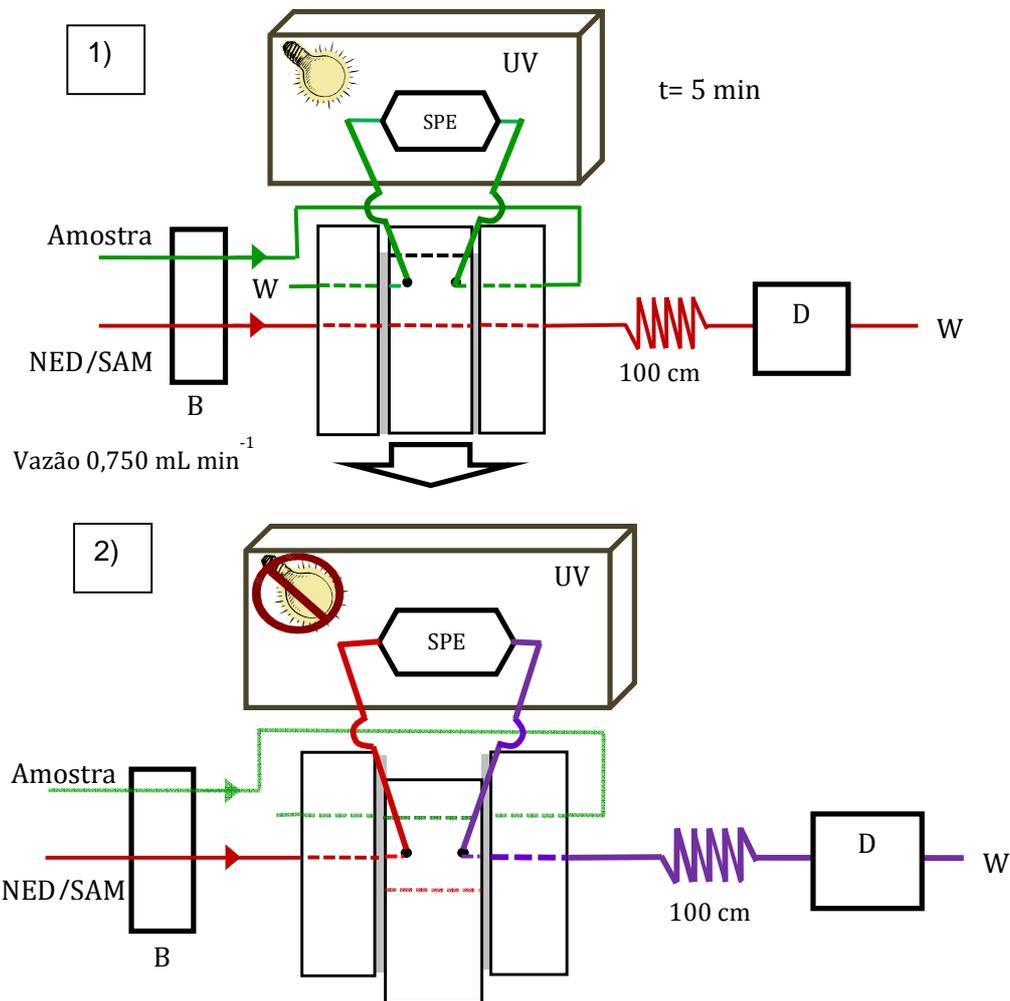
### 3.6.2.5.1. Montagem da coluna de SPE em linha

Para a estratégia de análise em fluxo, foi feita adaptação do cartucho de fase sólida na forma de uma coluna para extração feita com ponteiros de micropipetas, conforme ilustrado na Figura 14. Para isto, 80 mg da fase sólida retirada dos cartuchos fora acondicionados nas ponteiros, cujas terminações haviam sido preenchidas com lã de vidro de modo a evitar vazamentos, mas permitir o fluxo. As partes largas das ponteiros foram unidas com uma resina polimérica.



**Figura 14 – Esquema de montagem da fase sólida em fluxo.** Adaptado de Dias *et al.* <sup>51</sup>

Esta coluna foi acoplada ao sistema de análise em fluxo em uma nova configuração, cujo esquema é apresentado na Figura 15. Neste sistema, a amostra era mantida em circulação, impulsionada pela bomba peristáltica no sentido oposto ao da solução de NED/SAM, de modo a evitar acúmulo e entupimento da fase sólida ao passar pela coluna de SPE dentro do foto-reator com a lâmpada UV ligada. Após 5 minutos era acionada a posição de injeção, na qual a solução de NED/SAM, também impulsionada pela bomba peristáltica, era inserida no canal da solução da amostra, percorrendo o caminho em direção ao foto-reator. Neste momento a lâmpada UV é desligada e a solução de NED/SAM reagia com os íons nitrito e nitrosil retidos na fase sólida, formando produto colorido que era eluído na sequência. Este produto passava por uma bobina reacional de 100 cm e chegava até o detector.



**Figura 15 – Representação esquemática do sistema de análise em fluxo com SPE e fotoderivatização em linha.** 1) posição de amostragem, 2) posição de injeção. B) Bomba peristáltica, SPE) coluna de extração em fase sólida, UV) Foto-reator (com lâmpada de 11 W), D) Detector e W) descarte. As linhas tracejadas representam os canais no interior do injetor; as linhas sólidas correspondem às alças de tubos de PTFE externas. A seta indica o movimento da peça interna do injetor quando acionada a posição de injeção, alterando os caminhos das soluções.

Com este sistema, foram feitos experimentos com soluções padrão de NNG.

### **3.6.2.5.2. Estudo dos parâmetros do método no sistema em fluxo com fotoderivatização e SPE combinados em linha**

Uma solução padrão de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  foi submetida a análise pelo sistema descrito em 3.3.2.5.1, seguindo comparação com branco. O experimento foi feito em triplicata.

Um procedimento analítico foi então estabelecido para testes posteriores.

### **3.6.2.5.3. Procedimento analítico**

- Inicia-se a vazão da bomba peristáltica a  $0,750 \text{ mL min}^{-1}$ , com cada solução em seu respectivo canal, conforme esquematizado na Figura 13, mantendo-se o injetor na posição de amostragem e com a lâmpada UV ligada;
- A amostra percolou a coluna SPE dentro do foto-reator, estando exposta à radiação UV pelo período de 5 minutos. Paralelamente, a solução de NED/SAM era impulsionada em seu próprio caminho, alheio à etapa de fotoderivatização, em direção ao detector;
- Alterou-se a posição para injeção e desliga-se a lâmpada UV;
- Na posição de injeção, o segmento de NED/SAM foi inserido no canal da solução da amostra, sendo impulsionado até a coluna de SPE no interior do foto-reator;
- A solução de NED/SAM reagiu com os íons nitrito retidos na coluna de troca iônica, formando o produto colorido da reação de Griess;
- Este produto seguiu sendo impulsionado eluindo pela coluna em direção a uma bobina de 100 cm e por fim ao detector, onde ocorreu a coleta do sinal analítico.

Este procedimento foi aplicado também para os testes com amostras.

#### **3.6.2.5.4. Testes com amostras reais**

Amostras de produto técnico sólido de glifosato foram preparadas conforme procedimento descrito por Bioagri Laboratórios:<sup>64</sup> foram pesados 1,5 g da amostra em um béquer, e adicionados 5,0 mL de água deionizada. A suspensão foi levada a ultrassom por 5 minutos e posteriormente levada à centrífuga a 2500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi inserido no sistema para análise conforme procedimento descrito no item 3.3.2.5.3, e o resultado avaliado visualmente frente a uma alíquota não processada da amostra.

## ***4. Resultados e Discussão***

## **Resultados e Discussão**

Os resultados aqui descritos, bem como as discussões relacionadas dizem respeito aos experimentos e testes descritos no item 3.3.

### **4.1. Derivatização do NNG**

#### **4.1.1. Derivatização Química**

Nos experimentos de derivatização química realizados seguindo a abordagem experimental proposta por Kim *et al.*, pôde-se confirmar a influência do ácido utilizado e do aquecimento aplicado, sem os quais a derivatização não se processa, ou se processa com extrema lentidão. Conforme procedimento descrito no item 3.3.1.1, os experimentos realizados para tal observação consistiram na mistura de solução padrão de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  com HCl a  $4,5 \text{ mol L}^{-1}$  e solução de NED/SAM, posteriormente submetida a aquecimento a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 minutos. O produto colorido gerado foi analisado espectrofotometricamente.

Foi investigada a eficiência desta reação nestas condições, comparando-se os sinais analíticos obtidos da reação de Griess com solução padrão de  $\text{NO}_2^-$  em concentração correspondente ao que se obteria de uma derivatização completa de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , conforme o seguinte raciocínio:

- Para cada mol de NNG derivatizado obtém-se 1 mol de radical nitrosil;
- A massa molar do NNG é de  $196,07 \text{ g mol}^{-1}$  e a do radical nitrosil é  $30 \text{ g mol}^{-1}$ ;
- Cada  $1,0 \text{ mg}$  de NNG corresponde, portanto, a  $0,15 \text{ mg}$  de NO;
- O radical  $\text{NO}^\bullet$  liberado em meio aquoso é rapidamente transformado em  $\text{NO}_2^-$ ,<sup>32</sup> que é de fato a espécie que atua na etapa de diazotação da reação de Griess. O material à disposição para uso prático são portanto as soluções de  $\text{NO}_2^-$ ;
- A solução de  $\text{NO}_2^-$  é preparada a partir de  $\text{NaNO}_2$ , cuja massa molar é de  $69 \text{ g mol}^{-1}$ . Cada mol de  $\text{NaNO}_2$  corresponde a 1 mol de NO, então para a quantidade de  $\text{NaNO}_2$  correspondente a  $0,15 \text{ mg}$  de NO, tem-se  $0,345 \text{ mg}$  de  $\text{NO}_2^-$ ;
- Para uma solução padrão de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de NNG, a solução de  $\text{NO}_2^-$  correspondente deve ter a concentração de  $0,345 \text{ mg L}^{-1}$ .

Uma solução de  $\text{NO}_2^-$  a  $0,345 \text{ mg L}^{-1}$  foi misturada à solução de NED/SAM, gerando um produto colorido que foi submetido à análise espectrofotométrica, de maneira a permitir comparação entre os sinais analíticos desta solução com os sinais obtidos da reação de Griess após derivatização química de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Cabe ressaltar que a reação de Griess com  $\text{NO}_2^-$  se processa rapidamente em meio aquoso e à temperatura ambiente, não requerendo, portanto, adição de ácido ou aquecimento como no caso do NNG.

Os resultados obtidos dos experimentos feitos em triplicata são sumarizados na Tabela 2, em que se pode notar que a derivatização química apresenta repetitividade, porém sua eficiência é de aproximadamente 85%.

**Tabela 2 – Resultados do experimento de eficiência da derivatização química de NNG.**

Experimento	Absorbância média (máx. em 540nm)	Desvio padrão
$\text{NO}_2^-$ a $0,345 \text{ mg L}^{-1}$ (n=3)	0,0523	0,0007
NNG a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (n=3)	0,0443	0,0007

Estudos da eficiência de derivatização química do NNG não são apresentados na literatura, dando indícios de que é assumida como 100 %. Como consequência, é possível que resultados analíticos gerados por este método estejam subdimensionados, o que se mostra como uma desvantagem deste procedimento. Para um sistema de análise por injeção em fluxo, isto é um problema contornável, caso a taxa de conversão seja conhecida, reproduzível e controlada.

Outro problema relacionado a este método diz respeito à reação de retirada do grupo NO da molécula de N-nitrosamina, a qual é favorecida em meio fortemente ácido, ocorrendo, conforme sugerido na literatura, o enfraquecimento da ligação N-NO ocasionado pela protonação e seu rompimento devido ao aquecimento. Estas condições reacionais podem impor dificuldades à automação em um sistema de análise

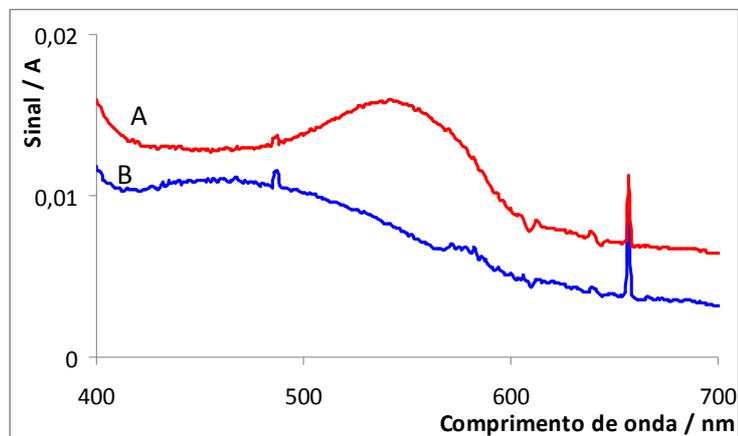
por injeção em fluxo, já que o aquecimento das soluções aquosas a cerca de 95 °C gera muitas bolhas e alta concentração ácida pode degradar os tubos e as partes mecânicas (como válvulas e injetores), além de interferir na medida espectrofotométrica pelo gradiente de concentração frente às demais soluções utilizadas.

Por estas razões, buscou-se abordagens alternativas que eliminassem estas particularidades e viabilizassem a análise por injeção em fluxo – FIA.

#### **4.1.2. Experimentos com reagentes alternativos para a denitrosilação**

Ainda buscando alternativas de derivatização química que viessem a eliminar a necessidade de alta concentração ácida e aquecimento para a derivatização, foram empreendidos experimentos em batelada utilizando o reagente alquilante Dimetilsulfato (DMS). Em tese, este promoveria a metilação no sítio N-NO da molécula, propiciando maior facilidade à clivagem desta ligação, resultando na liberação do íon nitrosil. Todavia, não foram encontradas aplicações semelhantes na literatura que pudessem guiar os experimentos. Para esta reação, diversos solventes polares apróticos foram testados, com o objetivo de conciliar a total solubilização do NNG com a integridade do DMS, o qual hidrolisa em solventes próticos tornando-se impróprio para uso na reação. O único solvente que uniu estas características foi Dimetilsulfóxido (DMSO).

Os resultados dos testes de derivatização do NNG com o reagente alquilante DMS são apresentados na Figura 14. Os espectros UV-Vis evidenciam que a reação ocorreu como esperado, resultando na formação do produto da reação de Griess após a adição da solução de NED/SAM, com absorção máxima no comprimento de onda 540 nm, porém em intensidade relativamente baixa.



**Figura 16 – Resultados dos testes de derivatização química com o reagente metilante DMS.** A) Espectro do produto da reação de Griess após derivatização do NNG a  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  com DMS em DMSO; B) Espectro da solução de NNG a  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em DMSO com adição do reagente de Griess, sem DMS.

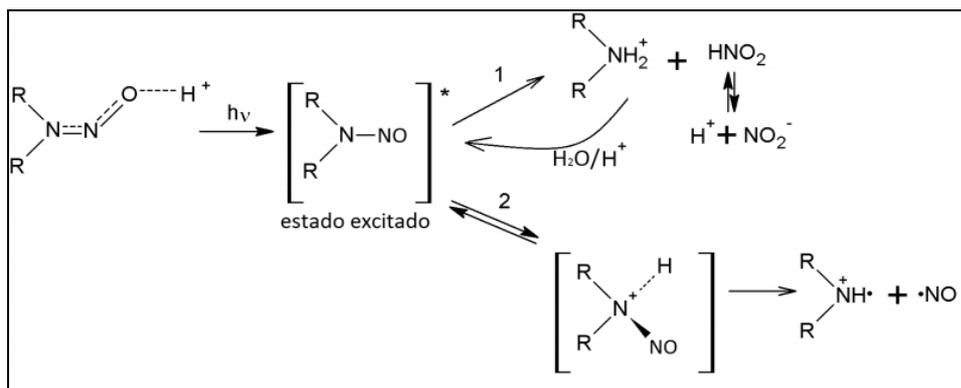
O DMS, apesar de sua eficácia na derivatização, possui sérias desvantagens que podem dificultar ou até inviabilizar o processo analítico em rotina, como:

- I. Sua toxicidade e as condições complexas requeridas para sua manipulação;
- II. O fato de ser um reagente pouco comum em laboratórios de análise;
- III. Seu alto custo;
- IV. O fato de hidrolisar em solventes próticos como água, que é essencialmente o meio em que sistemas em fluxo são trabalhados, e no qual estará o analito em questão. Dentre os solventes polares apróticos testados, apenas o DMSO se mostrou apto, já que foi capaz de solubilizar NNG e não interferiu na leitura espectrofotométrica.

Assim, esta estratégia foi abandonada, uma vez que não resolveria completamente os problemas impostos à automação, e ainda traria outras preocupações. A derivatização fotoquímica mostrou-se uma solução em potencial, e foi então colocada em teste.

### 4.1.3. Derivatização Fotoquímica

Conforme relatado na Seção 2, há na literatura algumas aplicações de fotoderivatização para determinação de N-nitrosaminas em matrizes diversas, e tais procedimentos foram tomados como guia para os experimentos. Do ponto de vista do mecanismo reacional, não há descrição da foto-reação de NNG, porém há algumas propostas para outras N-nitrosaminas mais simples, das quais se pode ter uma ideia de como se processa a clivagem da ligação N-NO. A Figura 17 descreve as duas rotas possíveis para a clivagem fotolítica de N-nitrosaminas, comentadas no item 2.4, em que se nota a liberação de íons nitrito necessários para a determinação espectrofotométrica por meio da reação de Griess. Como mencionado, a clivagem heterolítica (1) é favorecida em razão do ataque nucleofílico da molécula de água. Pressupõe-se que o NNG se comporte de maneira semelhante, tendo em vista sua estrutura.



**Figura 17 – Mecanismo de fotoderivatização de uma N-nitrosamina, em duas possíveis rotas reacionais:** 1) clivagem heterolítica, resultando em íons nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ); 2) clivagem homolítica, resultando em radicais nitrosil ( $\text{NO}^\bullet$ ). Adaptado de Lee.<sup>44</sup>

Os primeiros testes de derivatização fotoquímica foram feitos expondo soluções padrão de NNG ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) contidas em béqueres à radiação UV dentro de uma caixa completamente vedada por curtos intervalos de tempo (até 15 minutos). Tendo sido constatado visualmente que a derivatização de fato ocorreu, devido à geração da coloração rosa após adição de solução de NED/SAM, passou-se a estudar os

parâmetros que governam a eficiência do processo, em especial a potência da lâmpada e o tempo de exposição. Salvo onde indicado, os experimentos de exposição do NNG à radiação UV se deram em água deionizada sem adição de ácido.

#### **4.1.3.1. Potência da lâmpada UV**

As diferentes características técnicas das Lâmpadas UV produzem resultados distintos para a eficiência da fotólise, uma vez que a eficiência da foto-reação está diretamente relacionada à potência da radiação incidente no sistema químico. Segundo Princípio de Stark-Einstein (conhecido como Lei da Fotoequivalência), para cada fóton absorvido por um sistema químico, uma molécula é ativada para ocasionar uma reação posterior.<sup>66</sup> A energia desses fótons também deve ser levada em conta, e no caso das reações fotoquímicas, estas se processam de modo geral na região de comprimento de onda de 200 a 800 nm, mais especificamente na região UV-C (de 200 até 290 nm), que é a região mais energética da janela espectral na região do UV. Por isso a escolha de lâmpadas UV que emitem no comprimento de onda 254 nm, que é justamente o comprimento de onda adequado para clivagem da ligação N-NO em N-nitrosaminas.<sup>44</sup>

Abaixo são apresentados os resultados obtidos com as lâmpadas UV de 4 W, 11 W e 125 W, a partir de experimentos nos quais soluções padrão de NNG a 1,0 mg L<sup>-1</sup> foram expostas em béqueres à radiação de cada lâmpada, variando-se acidez e tempo de exposição. Após a etapa fotolítica, foi adicionado reagente de Griess a cada uma das soluções de NNG, verificando-se a geração de cor.

##### **I. Lâmpada de 4 W**

Observou-se que mesmo aumentando o tempo de exposição (15, 30, 60, 90 e 120 segundos) ou incrementando a condição ácida do meio (com adições de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10% e HCl a 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 0,5 mol L<sup>-1</sup>) não se obteve geração de produto colorido com reagente de Griess e nem sinal espectrofotométrico para soluções de NNG nas concentrações de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, 39,6 mg L<sup>-1</sup> (0,2 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) e 3,96 g L<sup>-1</sup> (20 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>), provavelmente devido à baixa potência da lâmpada, ineficiente para a foto-clivagem do NNG.

## II. Lâmpada de 125 W

Testes com soluções padrão de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  expostos à lâmpada de 125 W (lâmpada de vapor de Hg sem o bulbo externo) permitiram observar que a fotoderivatização é eficiente com poucos segundos de exposição, o que foi evidenciado visual e espectrofotometricamente após a adição da solução de NED/SAM. Os testes trouxeram resultados favoráveis mesmo sem ajustes de acidez, como explorado no experimento anteriormente descrito. Conforme pressuposto, a potência elétrica da lâmpada, traduzida em termos de seu fluxo radiante, era fator limitante do método utilizando a lâmpada de 4 W, e aqui pôde-se constatar que a derivatização fotoquímica é um procedimento factível para o objetivo almejado.

Entretanto, a lâmpada de 125 W trouxe pelo menos dois grandes inconvenientes: i) as altíssimas temperaturas que a lâmpada pode atingir (cerca de  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , segundo especificações do fabricante), o que impede que se enrole futuramente a bobina de PTFE sobre ela quando da montagem do sistema em fluxo com fotoderivatização acoplada. Esse aquecimento traz a possibilidade real de surgimento de bolhas dentro do sistema, o que exigirá um sistema de ventilação mais potente; e ii) o funcionamento desta lâmpada gera gás ozônio intensamente, o qual é relativamente tóxico,<sup>67</sup> requerendo trabalhar com o foto-reator dentro da capela.

Para esta lâmpada, não foram encontradas especificações de fluxo radiante ou outras informações que permitissem conhecer seu rendimento do ponto de vista fotolítico, isto é, o quanto de radiação é emitido no comprimento de onda de 254 nm, almejado para a efetiva clivagem fotolítica.

A lâmpada com características mais próximas cujos dados técnicos estão disponíveis, e que pode ser usada para uma estimativa de desempenho, é a de vapor de Hg de 400 W, na qual praticamente apenas a metade desta potência se converte em radiação, sendo cerca de 60 W na faixa do visível, 60 W na faixa do infravermelho e cerca de 73 W na região do UV,<sup>68</sup> não restrita a 254 nm. Isto se traduz em um rendimento baixo que não compensa os contratempos enfrentados por essa lâmpada, como a alta temperatura, as dificuldades de manuseio e a geração de ozônio.

A distribuição espectral de uma lâmpada como esta apresenta cerca de 66 % de radiação no comprimento de onda 254 nm e cerca de 23 % no comprimento de onda 185 nm, sendo este o principal responsável pela formação de ozônio a partir do oxigênio do ar.<sup>69</sup>

Embora tenha demonstrado eficiência na fotoderivatização do NNG, comprovada com a posterior reação de Griess, a lâmpada de 125 W foi abandonada em razão de suas dificuldades de operacionalização para alcançar o objetivo de acoplar a etapa de derivatização fotoquímica a um sistema de análise em fluxo. Optou-se então por testar uma terceira lâmpada, que apresentasse eficiência para a foto-reação, sem os problemas observados até este momento. Uma lâmpada de 11 W foi então submetida a testes.

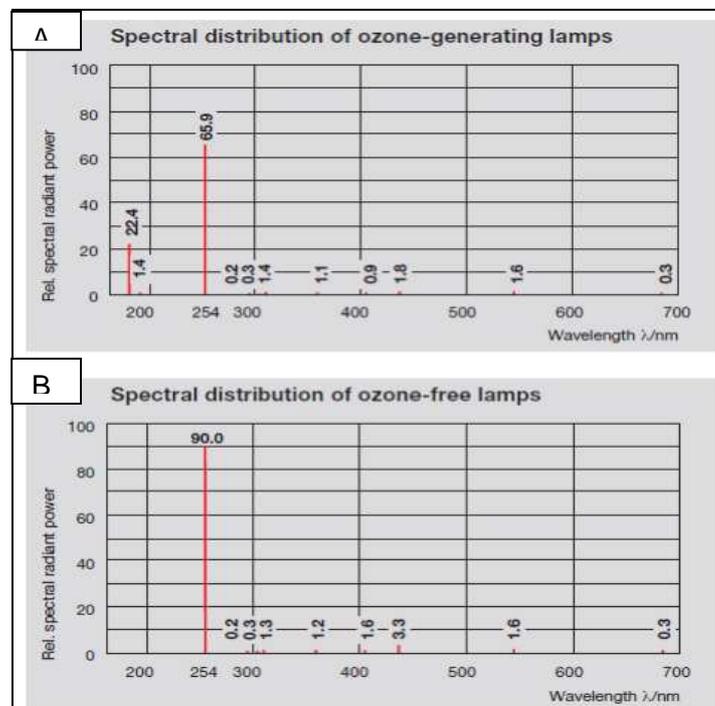
### III. Lâmpada de 11 W

Os resultados dos testes em batelada com a lâmpada de 11 W são mostrados na Tabela 3, em que pode se observar a eficiência da fotoderivatização. Observa-se que a fotoderivatização do NNG e posterior reação de Griess produziu um sinal analítico de intensidade próxima àquele obtido pelo método convencional em um terço do tempo (5 minutos de exposição contra 15 minutos de aquecimento). Os experimentos foram realizados conforme item 3.3.1.3.1, com soluções padrão de NNG a 1,0 mg L<sup>-1</sup> expostas à radiação, posteriormente misturadas à solução de NED/SAM.

**Tabela 3 – Resultados de reação de Griess com NNG após derivatização ácida e após derivatização fotoquímica.**

Experimento	Absorbância média (max. 540nm)	Desvio Padrão
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (n=3)	0,0523	0,0007
NNG – Aquec., 15 min. (n=3)	0,0443	0,0007
NNG – UV, 5 min. (n=3)	0,0383	0,0016

Em termos práticos, a lâmpada de 11 W adquirida tem diversas vantagens em relação à de 125 W: A temperatura de aquecimento quando ligada é muito menor, seu formato permite enrolar a bobina sobre si, e praticamente não produz ozônio, já que seu comprimento de onda predominantemente emitido é justamente de 254 nm. Esta lâmpada pertence a uma categoria de lâmpadas germicidas não geradoras de ozônio, como se pode notar por sua distribuição espectral ilustrada na Figura 18. Observa-se cerca de 90 % de emissão no comprimento de onda 254 nm e valores ínfimos no comprimento de onda 185 nm. Nestas lâmpadas são utilizados vidros especiais ou certos tipos de quartzo transparentes à radiação de 254 nm, mas que bloqueiam a emissão em 185 nm.



**Figura 18 – Distribuição espectral da lâmpada UV de 11 W:** A) lâmpada geradora de ozônio; B) lâmpada não-geradora de ozônio. Fonte: OSRAM UV-C Puritec HNS germicidal lamps Technical Information Brochure.

Ainda quanto ao seu rendimento em termos de emissão no comprimento de onda de 254 nm em relação a sua potência, pode-se notar na Tabela 4 um ganho considerável em termos de fluxo radiante neste comprimento de onda. Logo, a lâmpada

de 11 W tem também melhor resposta do que a de 4 W anteriormente testada. A rigor, suas únicas desvantagens são o custo (relativamente mais alto do que os demais tipos), e sua escassa disponibilidade no mercado local.

**Tabela 4 – Características técnicas das lâmpadas UV utilizadas.** (Fonte: Specification Sheet GCF11DS/G23/SE/OF e HNS 4W G5 (G4T5/OF) - OSRAM Gmbh)

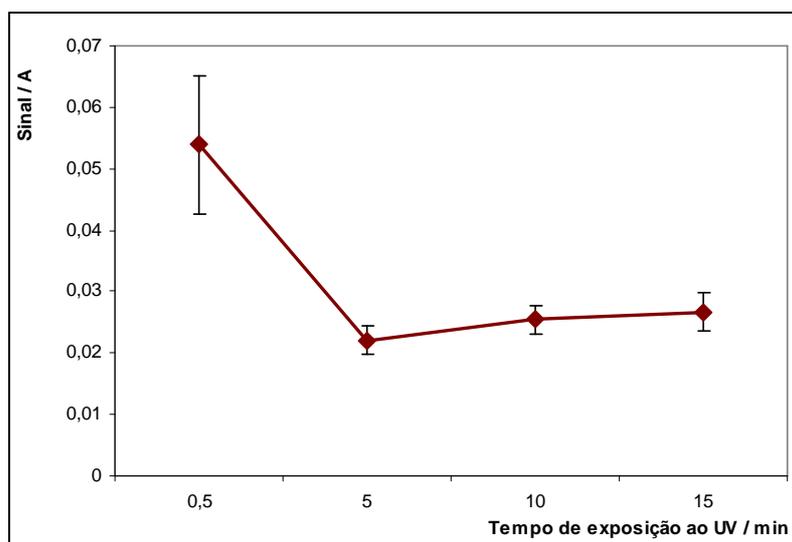
Lâmpada	Germicida HNS 4W G5	HNS S11W G23
Potência da lâmpada	4 W	11 W
Fluxo radiante (254nm)	0,9W	3,4W
Vida útil	6000 horas	8000 horas
Irradiação UV inicial (W/m <sup>2</sup> ) a 1m de distância	>0,39	>0,09
Irradiação UV inicial (W/m <sup>2</sup> ) a 1m de distância após 8000 h	>0,29	>0,05
Geração de ozônio	Não	Não

A diferença entre os fluxos radiantes no comprimento de onda foi aparentemente o fator crítico para a efetiva fotoderivatização do NNG, não alcançada pela lâmpada de 4 W. Observou-se, portanto, que a lâmpada de 11 W era a mais adequada ao propósito, por apresentar eficiência à foto-reação e ao mesmo tempo ser de fácil manuseio e acoplamento ao sistema FIA a ser construído. Com esta lâmpada, passou-se a investigar o comportamento da eficiência da fotoderivatização frente ao tempo que a amostra permanece exposta à radiação.

#### 4.1.3.2. Tempo de exposição

Além da potência da lâmpada, o tempo de exposição da amostra à radiação UV também é parâmetro crucial para a implementação da fotoderivatização em sistemas de análises em fluxo. Assim, a eficiência de fotoderivatização em diferentes intervalos de tempo foi estudada, expondo à radiação soluções padrão de NNG a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em

água deionizada em béqueres por intervalos decrescentes, iniciando em 15 minutos até 30 segundos. Os resultados mostrados na Figura 17 denotam uma grande perda de sinal analítico entre 30 segundos e 5 minutos de exposição à radiação UV. Nos períodos entre 5 e 15 minutos, entretanto, não há diferença significativa. O excesso de exposição à radiação aparentemente prejudica a medida, conforme exposto em outras referências, talvez por uma oxidação de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ ,<sup>70</sup> ou pela fotólise do próprio nitrito, gerando radicais nitrosil e hidroxila,<sup>71</sup> os quais podem desencadear outras transformações nas moléculas em solução. Assim, o procedimento fotoquímico pode ser realizado de forma muito mais célere do que o método convencional, o que se traduz em maior frequência analítica. Além disso, os resultados demonstram a boa repetitividade do método.

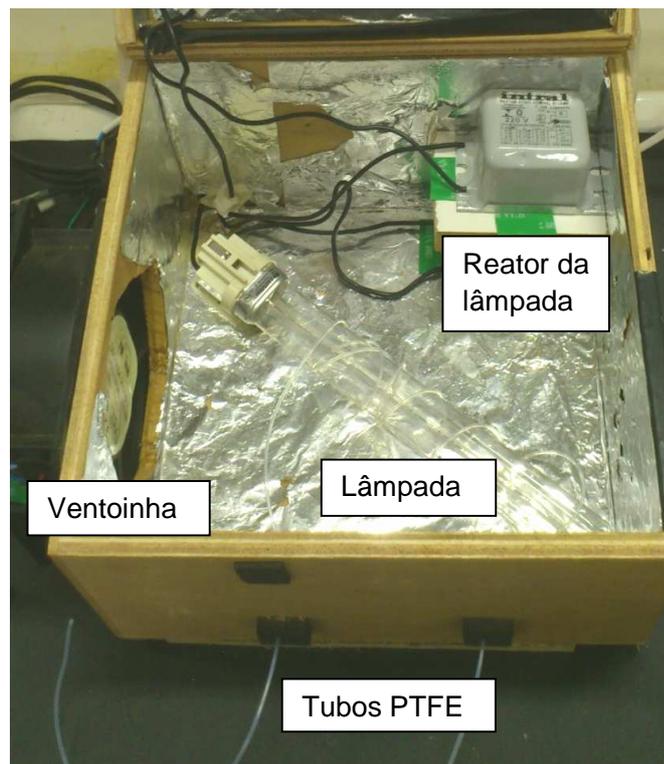


**Figura 19 – Resultados de reação de Griess com NNG 1,0 mg L<sup>-1</sup> conforme tempo de exposição à radiação UV.**

Com estes resultados é possível perceber que a fotoderivatização é perfeitamente adequada aos propósitos da determinação espectrofotométrica de NNG por um sistema de análise em fluxo, uma vez que é eficiente, reproduzível, simples, rápida e não tem os inconvenientes da alta concentração ácida e aquecimento necessários à derivatização química dos métodos atualmente utilizados.

Estabelecidos os parâmetros de potência da lâmpada e do tempo de exposição necessário, foi montado o foto-reator, conforme Figura 20. O dispositivo consistia em

uma caixa fechada, com aberturas somente para entrada e saída dos tubos de PTFE 0,8 mm d.i. do sistema FIA e para a ventoinha, instalada na lateral da caixa, para prevenir o aquecimento excessivo da lâmpada. Toda a caixa foi vedada, e os orifícios anteparados para impedir a exposição do analista à radiação diretamente. O interior foi revestido de papel alumínio de maneira a tornar toda a superfície interna reflexiva e assim aproveitar o máximo da radiação emitida.



**Figura 20 – Foto-reator aberto, mostrando lâmpada, seu reator e ventoinha, além das entradas de tubo de PTFE para inserção da amostra em fluxo.**

Este foto-reator foi então utilizado para os experimentos em fluxo, tanto em testes com soluções padrão de NNG como com amostras reais. A própria utilização de fotoderivatização é em si um passo importante na automatização do processo, sendo uma etapa acionada fácil e instantaneamente. Os demais componentes necessários à montagem do sistema de análises em fluxo, a saber, o programa computadorizado para controle de etapas e aquisição dos sinais e o detector fotométrico, são apresentados a seguir.

## 4.2. Sistemas de análise por injeção em fluxo

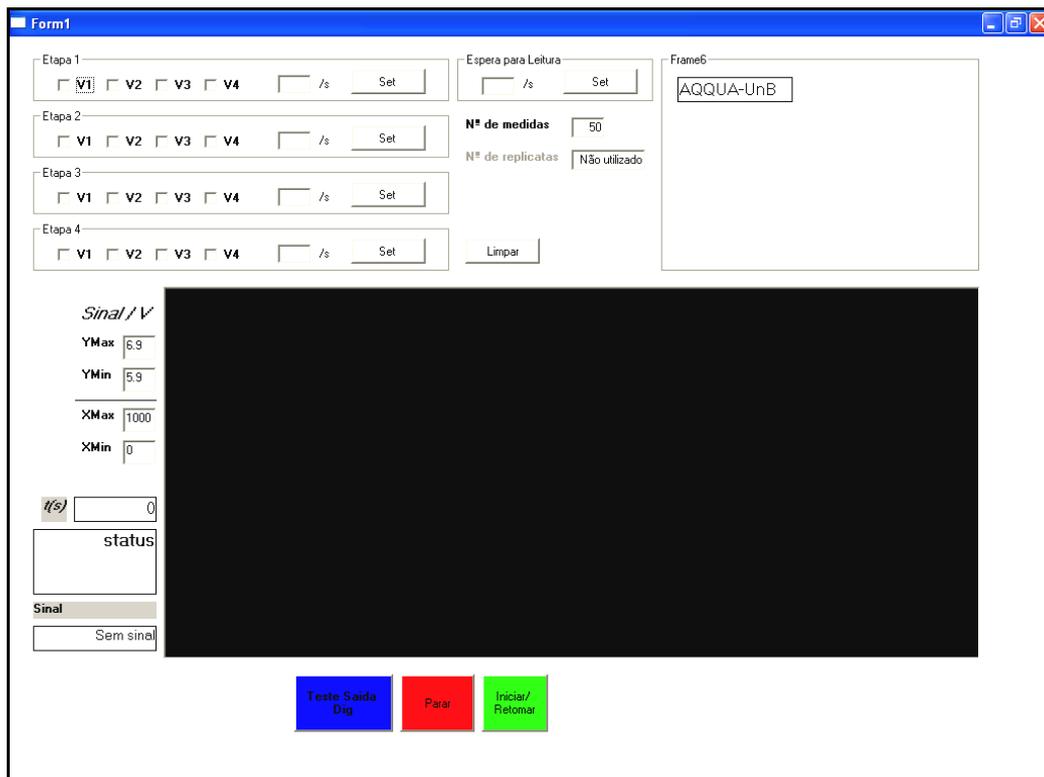
### 4.2.1. Desenvolvimento do programa computacional para controle das válvulas e aquisição de sinal analítico

O programa elaborado em linguagem Microsoft Visual Basic foi elaborado de maneira que permitisse o controle de etapas de um sistema de análise por injeção em fluxo, como o acionamento de válvulas solenoides de 3 vias e a aquisição de dados do detector, por meio de uma interface amigável ao usuário.

A tela do programa, conforme apresentada na Figura 21, é composta por algumas funcionalidades que podem ser separadas em seções:

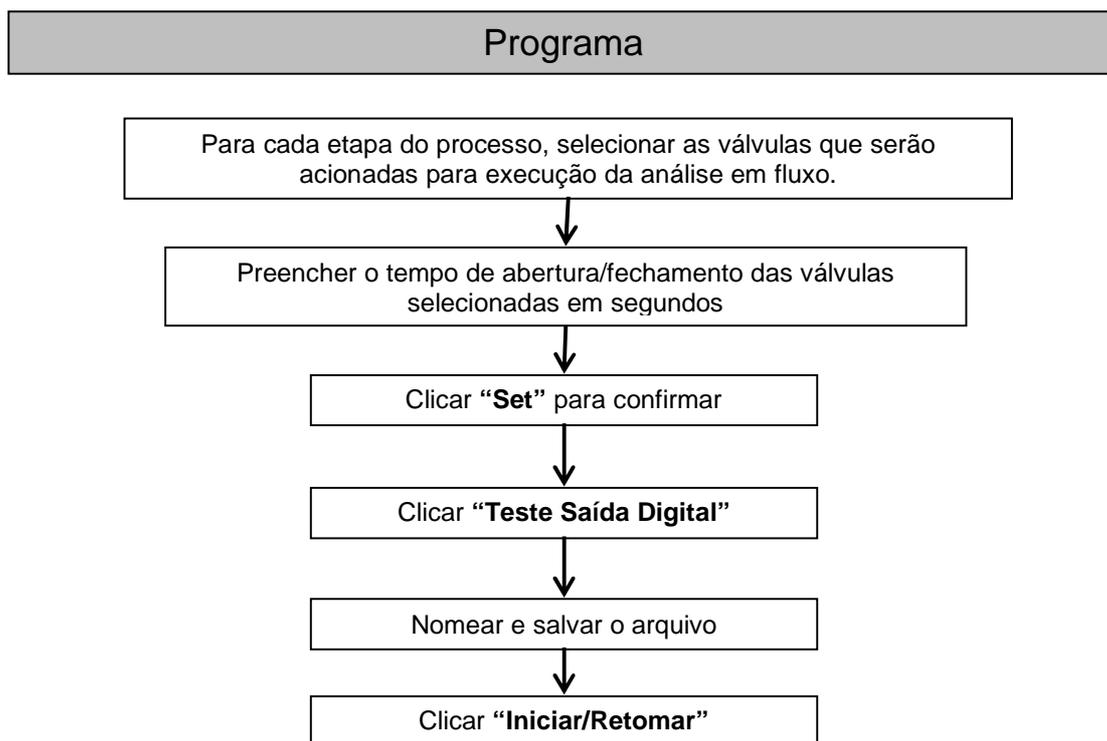
- **Etapas:** os *checkboxes* definem as válvulas que deverão ser ligadas e desligadas, e o tempo em segundos que elas permanecerão desta forma. São previstas até 4 válvulas para uso concomitante, mas um número menor pode ser usado sem necessidades de alteração. Para utilizar mais válvulas, basta replicar o código da programação descrito, e inserir um *checkbox* na tela editável;
- **Leitura e número de medidas:** pode ser definido o tamanho da medida que se deseja realizar, conforme velocidade estimada do fluxo e tempo necessário para completa aquisição do sinal analítico. A visualização do sinal analítico em tempo real pode ser ajustada a critério do analista;
- **Escalas X e Y:** podem ser definidas as escalas de Y conforme intensidade do sinal (altura do pico) para melhor visualização, e X como o total de medidas a serem realizadas no procedimento, incluindo ou não as replicatas, a critério do analista;
- **Campos t(s), Status e Sinal:** O sistema informa o tempo transcorrido nas etapas definidas anteriormente e os respectivos nomes no campo Status. A intensidade do sinal é dada em valores numéricos em Volts (V) em tempo real no campo Sinal, à medida que a aquisição se processa;

- **Gráfico:** o sinal analítico transiente é registrado e projetado na tela, podendo ser visualizado em tempo real;
- **Botões Teste Saída Dig, Parar e Iniciar/Retomar:** botões azul, vermelho e verde, respectivamente para salvar o arquivo com as configurações definidas antes da leitura, interromper a leitura e iniciar ou reiniciar a leitura interrompida.



**Figura 19 – Tela do programa elaborado para controle de válvulas solenoides e aquisição de sinal analítico.**

Para operação do programa durante uma análise, o procedimento recomendado é o apresentado na Figura 22:

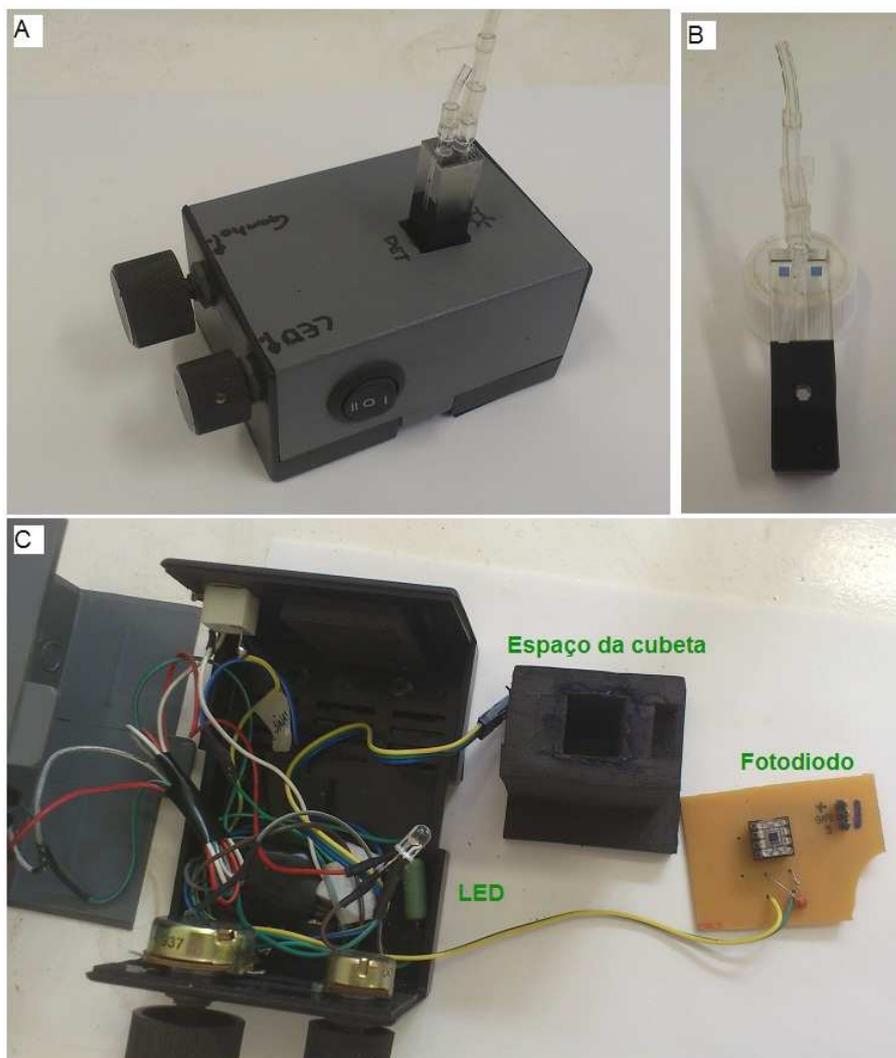


**Figura 22 – Fluxograma de operação do programa.**

Os dados de sinal analítico trabalhados neste programa foram obtidos por um detector fotométrico baseado em LED desenvolvido no próprio laboratório.

#### **4.2.2. Construção do detector fotométrico baseado em LED**

O dispositivo de detecção consistiu em um fotodiodo, um LED de cor verde e uma cubeta de fluxo. O LED de cor verde emitia radiação em comprimento de onda 540 nm, que corresponde ao máximo de absorção do produto da reação de Griess de coloração rósea, conforme esquematizado na Figura 23. O fotodiodo traduzia em sinal elétrico os fótons recebidos do LED e que passavam pela solução sob análise ao passo que esta atravessava o caminho óptico da cubeta de fluxo. Tanto a intensidade do LED como a sensibilidade do fotodiodo detector podiam ser ajustadas, de maneira a conferir maior sensibilidade à medida.



**Figura 23 – Foto do dispositivo de detecção.** A) Detector montado com cubeta e botões de ajuste de ganho e intensidade do LED; B) Cubeta de fluxo; C) Detector aberto, em que se vê o LED, o Fotodiodo e o espaço para inserção da cubeta.

De posse do programa de controle de etapas, do foto-reator e do dispositivo de detecção, passou-se à montagem do sistema FIA propriamente dito, visando o acoplamento da fotoderivatização.

O sistema completo compreendia uma bomba peristáltica para propulsão dos fluidos, foto-reator, bobina reacional e detector. O modo de injeção foi alvo de estudos conforme abordagem a seguir, a fim de se chegar ao formato mais eficiente.

### **4.2.3. Sistema de análise em fluxo por multicomutação com fotoderivatização**

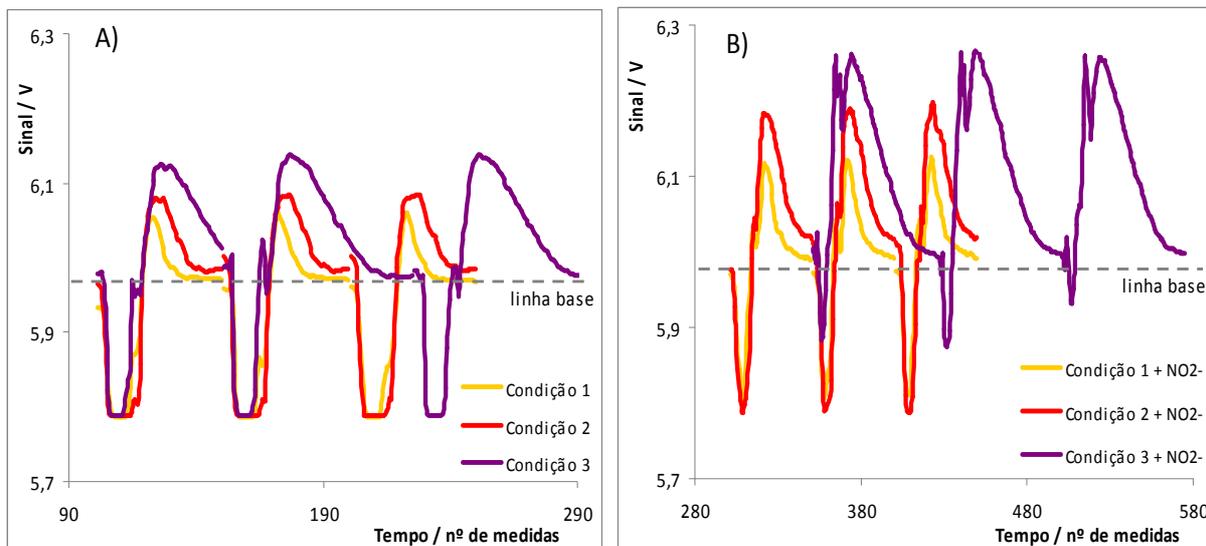
O primeiro sistema montado visando à adaptação da fotoderivatização consistiu foi baseado em multicomutação conforme apresentado esquematicamente na Figura 9, e cujo procedimento analítico foi descrito no item 3.3.2.3.3.

Antes de testes da fotoderivatização, utilizou-se esta configuração para experimentos de otimização da reação de Griess

#### **4.2.3.1. Otimização da reação de Griess**

Diversas composições do reagente de Griess com diferentes propósitos são apresentadas na literatura.<sup>60</sup> Todas obedecem ao mesmo princípio em termos de mecanismo reacional, mas diferem nas proporções de seus reagentes. Foram escolhidas 3 destas condições, conforme exposto na Tabela 1, para realização de experimentos de determinação de  $\text{NO}_2^-$  no sistema de multicomutação, com o objetivo de verificar a mais apropriada em termos de intensidade de sinal analítico obtido, perfil do pico e eventuais interferências. As composições testadas diferem em termos da proporção entre NED e SAM e a natureza e quantidade do ácido utilizado, conforme apresentado na Tabela 1, item 3.3.1.

Como se pode observar na Figura 24-A, o sinal analítico para o branco apresentou intensidade considerável. Nota-se que a intensidade desse sinal é quase metade da altura do sinal do produto obtido com a solução de  $\text{NO}_2^-$  (Figura 24-B). Do ponto de vista analítico, este fato compromete a sensibilidade do método, em especial para determinação de baixas concentrações da substância de interesse. Além disso, a forma do sinal com uma forte descida abaixo da linha base é característica da ocorrência do efeito conhecido como Schlieren, uma interferência que pode acometer medidas espectrofotométricas em fluxo.



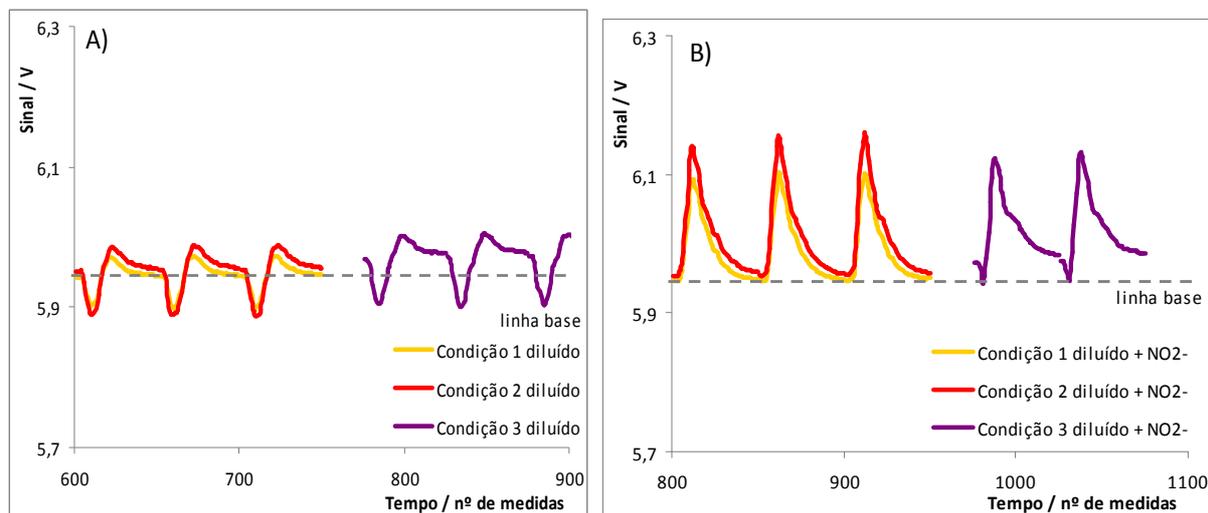
**Figura 24 – A) Registro dos sinais analíticos do branco em triplicata; B) Registro dos sinais analíticos de  $\text{NO}_2^-$  a  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$  em triplicata.** Condições: Transportador = água deionizada, Vazão =  $0,750 \text{ mL min}^{-1}$ , tempo de acionamento das válvulas V1 e V2 = 20 s, bobina reacional = 100 cm.

O efeito Schlieren (do alemão *Schliere*, plural para “borrão”) foi estudado em detalhe por Dias,<sup>72</sup> cujas observações levaram à proposição dos fatores que o influenciam e causam. Resumidamente, o efeito Schlieren advém de uma diferença entre os índices de refração óptica em um meio, e em geral leva a dois fenômenos: A) formação de lentes concêntricas no fluido, que causam deflexão do foco do feixe incidente em direção ao detector ou desviando-o, assim aumentando ou diminuindo a absorção; e B) formação de espelhos transientes no fluido, que diminuem a intensidade do feixe que atingirá o detector e causam um sinal ruidoso. O efeito em si é repetitivo e reproduzível.

Fica claro no experimento de determinação de  $\text{NO}_2^-$  que a grande diferença de concentração entre a solução do reagente de Griess e a solução transportadora é a causa do efeito Schlieren observado. Esta diferença tem por consequência a mudança abrupta de índices de refração na interface transportador/reagente do segmento que chega ao detector.

Para contornar este problema, foi proposta a diluição do reagente de Griess, de maneira que o sinal obtido do branco fosse minimizado, sem perda do sinal do analito. Os reagentes foram preparados diminuindo em 10 vezes as quantidades de NED, SAM

e de ácido utilizadas, completadas para o mesmo volume da preparação anterior. A Figura 25-A mostra os sinais dos brancos dos reagentes colorimétricos diluídos 10 vezes, enquanto a Figura 25-B mostra os sinais analíticos da reação destes com solução padrão de  $\text{NO}_2^-$  a  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ . No caso dos brancos, nota-se uma intensidade ainda detectável, mas muito mais adequada para a medição. Além disso, na determinação de  $\text{NO}_2^-$ , a parte negativa do sinal analítico praticamente desaparece com as diluições das proporções propostas nas condições 1 e 2. Em contrapartida, os sinais obtidos de  $\text{NO}_2^-$  são mais claros e mantêm intensidade adequada ao propósito da medição. Isto é importante, pois, em uma medida real de uma quantidade desconhecida de nitrito, a concentração de reagente deve ser tal que não interfira no sinal da espécie de interesse e nem seja limitante à reação.



**Figura 25 – A) Registro dos sinais analíticos do branco com NED/SAM diluído em triplicata; B) Registro dos sinais analíticos de  $\text{NO}_2^-$  a  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$  com NED/SAM diluído em triplicata.** Condições: Transportador = água deionizada, Vazão =  $0,750 \text{ mL min}^{-1}$ , tempo de acionamento das válvulas V1 e V2 = 20 s, bobina reacional = 100 cm.

Tentativas de balancear a acidez do fluido transportador com a do reagente de Griess foi realizada adicionando-se ácido na mesma proporção presente na solução de NED/SAM. A solução de  $\text{NO}_2^-$  foi preparada com adição de HCl na mesma quantidade prevista na Condição 1. Este procedimento não foi eficaz na supressão do efeito

Schlieren, permitindo concluir que a diluição foi a melhor alternativa. Assim, a Condição 1 diluída foi escolhida para continuidade na otimização dos parâmetros.

Observou-se que não houve diminuição pronunciada do sinal analítico de nitrito frente à nova condição diluída de NED/SAM, além de reduzir ainda mais o efeito Schlieren. A composição da solução de NED/SAM foi ainda explorada de modo a tornar seu preparo mais simples e econômico, mantendo-se a eficiência, estabelecendo-se então as seguintes proporções: 7,0 g L<sup>-1</sup> de SAM, 1,0 g L<sup>-1</sup> de NED e HCl 0,37 %. A solução preparada era diluída 4 vezes com água deionizada.

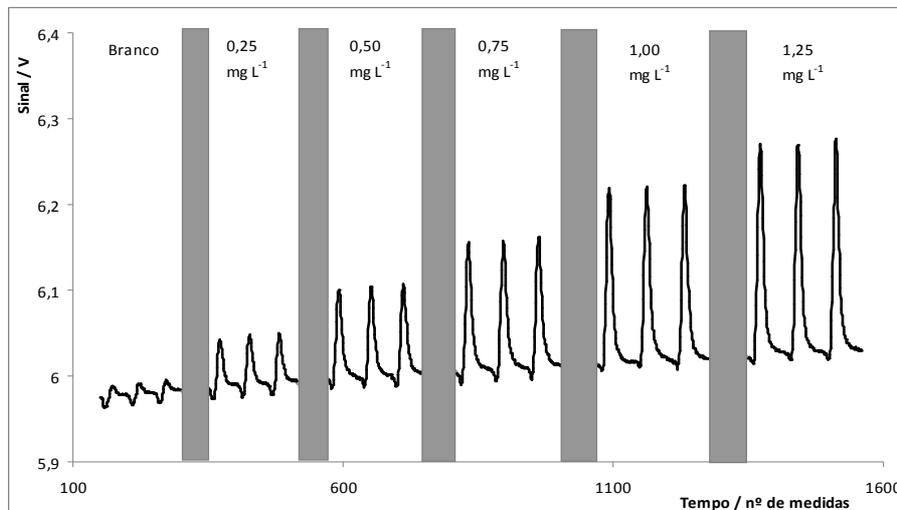
Após a definição da melhor composição para o reagente de Griess, passou-se aos experimentos com a fotoderivatização do NNG em fluxo.

#### **4.2.3.2. Estudo dos parâmetros do método no sistema multicomutação**

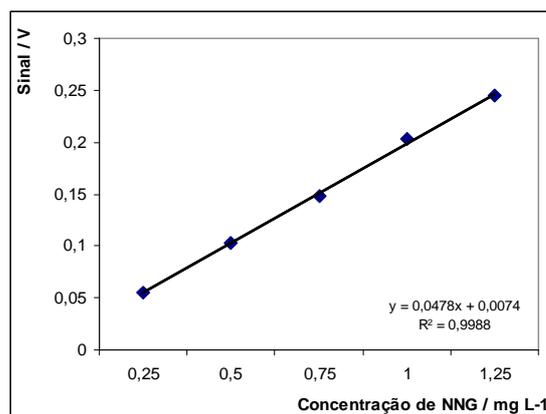
O foto-reator com lâmpada de 11 W foi acoplado ao sistema em multicomutação como mostrado na Figura 9, item 3.3.2.3 e na Figura 18, item 4.1.3.2. O procedimento seguido para os experimentos foi o mesmo mencionado anteriormente. Nestes estudos foram utilizadas soluções padrão de NNG em diversas concentrações e a solução de NED/SAM na composição otimizada. Água deionizada foi utilizada como transportador.

Observou-se que aproximadamente 20 segundos de exposição da amostra à lâmpada foram suficientes para que a derivatização ocorresse em nível considerado razoável, mesmo que a eficiência de conversão tenha sido inferior a 100 %. Além de substituir a etapa de aquecimento, a fotoderivatização foi alcançada sem utilização de ácido. Os resultados foram obtidos sem interrupção do fluxo.

Seguindo o procedimento mencionado no item anterior, foi verificada a faixa linear de trabalho do sistema em fluxo. A curva analítica apresentada na Figura 26 e o cálculo da linearidade na Figura 27 foram obtidos com 5 pontos e mais o branco, em triplicata. O nível mais baixo calibrado, em que se observou uma resposta analítica bem resolvida e de fácil diferenciação frente à intensidade de sinal do branco, foi de 0,25 mg L<sup>-1</sup>



**Figura 26 - Curva de calibração com solução padrão de NNG em 5 níveis mais o branco obtida no sistema por multicomutação.** Condições: Vazão = 0,750 mL min<sup>-1</sup>, potência da lâmpada = 11 W, tempo de exposição = 20 s. A área sombreada corresponde a sinais desconsiderados no experimento.



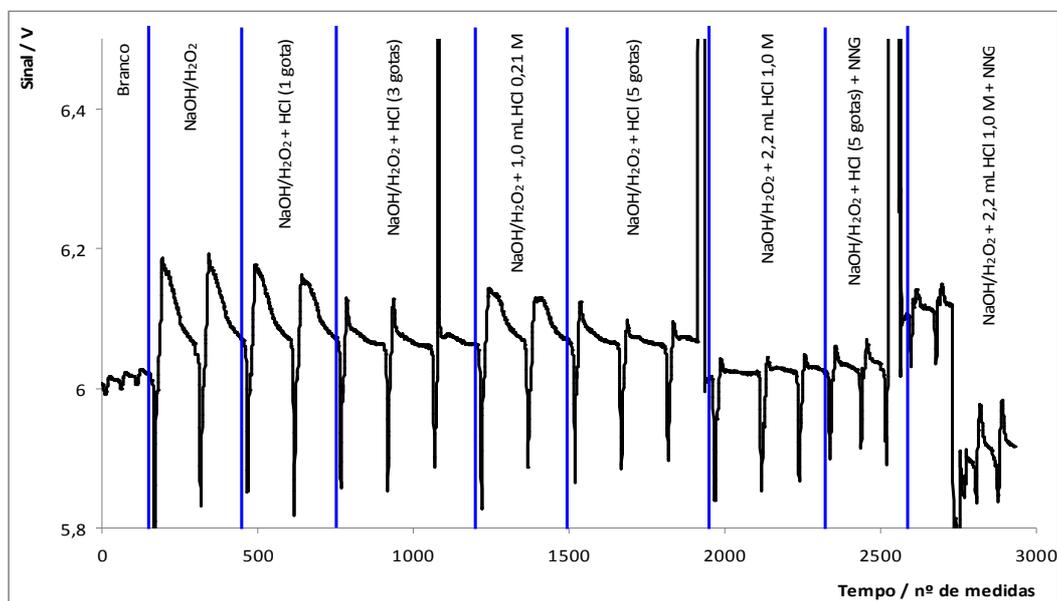
**Figura 27 – Curva analítica obtida com o sistema em fluxo por multicomutação.**

Estabelecendo-se a faixa linear de trabalho do sistema, foi definido o procedimento analítico a ser utilizado nos testes seguintes.

### 4.2.3.3. Testes com amostras reais

Neste procedimento, foram testadas amostras sólidas de produto técnico de Glifosato, preparadas conforme procedimento de referência AQC 684-86.<sup>35</sup> Foram injetadas alíquotas fortificadas com NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e outras não. Os resultados obtidos apresentaram forte interferência de efeito Schlieren, impossibilitando a determinação.

A resposta obtida destes experimentos levantou questões quanto à delimitação da zona de amostra e a concentração de seus componentes, o que teria causado a diferença abrupta de índices de refração do fluxo, perfazendo-se assim a componente física do efeito Schlieren. A própria solução de NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada na extração da amostra é capaz de impor interferência. Procurou-se minimizar o efeito pelo tratamento da solução da amostra extraída, conforme demonstrado na Figura 28. Observa-se que com adição de ácido visando a neutralização da solução é possível suprimir a parte positiva do sinal, mas não a parte negativa. Observa-se pelos sinais das fortificações com NNG que, por mais que a parte positiva se aproxime da linha de base, a medição ainda está comprometida pela parte negativa.



**Figura 28 – Sinais analíticos dos testes de branco de reagente, com adições de ácido para neutralização da solução de extração.**

Além disso, outro problema residia na constituição da matriz, a qual contém sais e surfactantes cuja informação não é acessível, chamados de “ingredientes inertes”. Estes podem dificultar a detecção fotométrica ao causar interferência também na forma de efeito Schlieren, devido às variações de índices de refração na zona de amostra e na interface com as demais soluções envolvidas na análise em fluxo.

Desta forma, na busca por melhores resultados, foi proposto outro formato de sistema em fluxo, com o qual a componente física do efeito Schlieren seria suprimida, sem haver necessidade de novas adições de ácido para neutralizar a solução. O sistema testado foi o de fluxo segmentado.

#### **4.2.4. Monosegmentado com fotoderivatização**

O objetivo da montagem do sistema em fluxo monosegmentado foi eliminar as diferenças abruptas de índices de refração nas interfaces de zona de amostra e demais soluções. Conforme esquema apresentado na Figura 10, esta configuração permite isolar o segmento de amostra e reagentes entre duas bolhas de ar controladas. Essa limitação promove uma melhor mistura, além de impedir a dispersão da zona de amostra em fluxo. Assim, além de eliminar a componente física do efeito Schlieren, espera-se também uma intensificação do sinal analítico obtido.

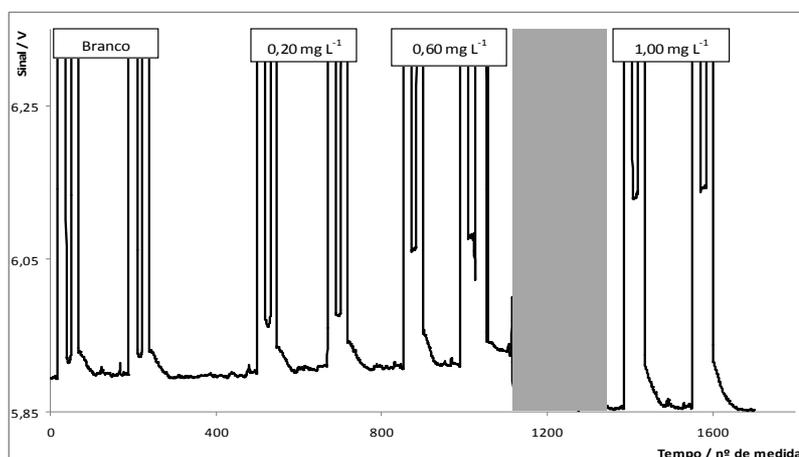
Todas as soluções e ar ambiente eram bombeados no sistema por uma bomba peristáltica em vazão de  $0,750 \text{ mL min}^{-1}$ , passando pelo injetor comutador em seus respectivos canais. Na posição de amostragem neste sistema, o NNG foi mantido na alça de amostragem de 50 cm após passar pelo foto-reator e sofrer irradiação. Nos outros canais, a solução de NED/SAM e ar eram bombeadas continuamente atravessando o injetor comutador. Quando da injeção, os caminhos eram alterados de forma que a solução de NNG na alça de amostragem era cercada por dois segmentos da solução de NED/SAM, conforme Figura 12. As extremidades eram delimitadas por duas bolhas de ar de tamanho controlado, isolando o segmento reacional e eliminando as mudanças abruptas de índice de refração no fluxo ao passar pelo detector. Todo este segmento era impulsionado em direção ao detector fotométrico.

A verificação do funcionamento deste sistema foi feita inicialmente com soluções padrão de NNG.

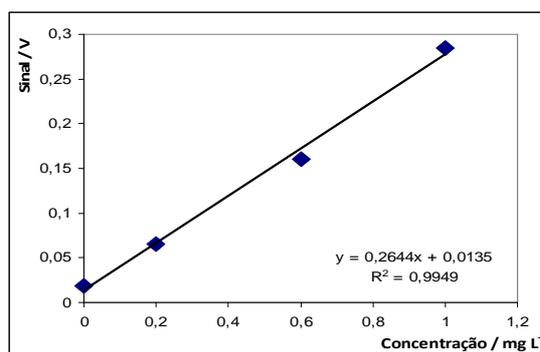
#### 4.2.4.1. Estudo dos parâmetros do método por sistema de fluxo monosegmentado

Para estes experimentos, foram utilizadas soluções padrão de NNG e reagente de Griess conforme preparo mencionado, e as leituras executadas conforme procedimento descrito anteriormente.

A Figura 29 apresenta o registro das soluções padrão de NNG obtido com o fluxo monosegmentado, em que o sinal analítico da zona de amostra se encontra entre os sinais das bolhas. A Figura 30 apresenta a curva analítica com sua regressão linear, em que se nota um comportamento linear na faixa estudada com as respostas das concentrações de analito.



**Figura 29 - Curva de calibração do sistema em fluxo monosegmentado em 3 níveis mais o branco, em duplicata.** Condições: Vazão = 0,750 mL min<sup>-1</sup>, potência da lâmpada = 11 W, tempo de exposição = 20 s. A área sombreada corresponde a sinais desconsiderados no experimento.



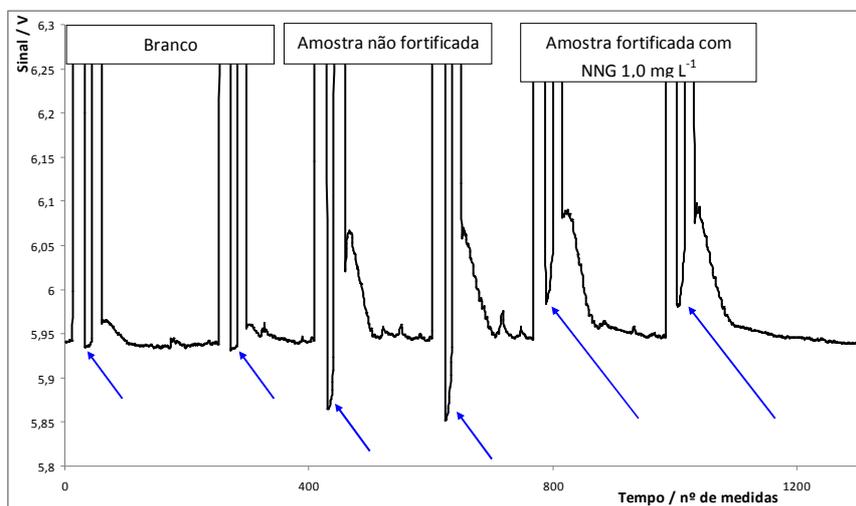
**Figura 30 – Curva analítica do sistema em fluxo monosegmentado.**

Estabelecendo-se a faixa linear de trabalho do sistema, foi definido o procedimento analítico a ser utilizado nos testes seguintes.

#### 4.2.4.2. Testes com amostras reais

Para complementar a supressão do efeito Schlieren observado no conjunto de experimentos anterior, foi alterado o preparo de amostra, passando a se utilizar o proposto por Bioagri Laboratórios.<sup>64</sup> Este preparo era mais simples, consistindo apenas da diluição da amostra de produto técnico sólido em um volume conhecido de água deionizada, submetido a ultrassom por 5 minutos. Foi feita filtração para retirada do sólido em suspensão, e este extrato foi submetido ao sistema de análise em fluxo monosegmentado. Foram submetidos à análise extratos fortificados com NNG e outros não fortificados.

Como se observa na Figura 31, o sinal analítico continuou apresentando efeito Schlieren. No entanto, já se nota uma evolução na clareza dos sinais analíticos, obtendo-se uma considerável diferenciação entre o comportamento das análises de amostra fortificada e não fortificada. Atribui-se a este comportamento uma componente química do efeito Schlieren, além de uma possível interferência dos constituintes da matriz à fotoderivatização ou à reação de Griess, ou a ambas, já que a intensidade de sinal da amostra fortificada com NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  se mostrou menor do que o esperado pelos testes com soluções padrão.



**Figura 31 – Sinais analíticos obtidos de testes com amostras reais em FIA monosegmentado com fotoderivatização.** As setas indicam os sinais do analito, entre bolhas.

Com estes resultados, passou-se a investigar a possível interferência dos constituintes da matriz, em especial o glifosato, por ser o componente majoritário na amostra.

#### 4.2.4.3. Estudo de interferência da matriz

É sabido que o Glifosato pode seguir o caminho reacional da nitrosação, formando moléculas íntegras de NNG, o que não deixa íons nitrosil livres para as etapas de diazotação e acoplamento da reação de Griess. De fato, este princípio foi utilizado em publicações anteriores como um método de determinação de resíduos de glifosato em solos e águas.<sup>26,27,28</sup>

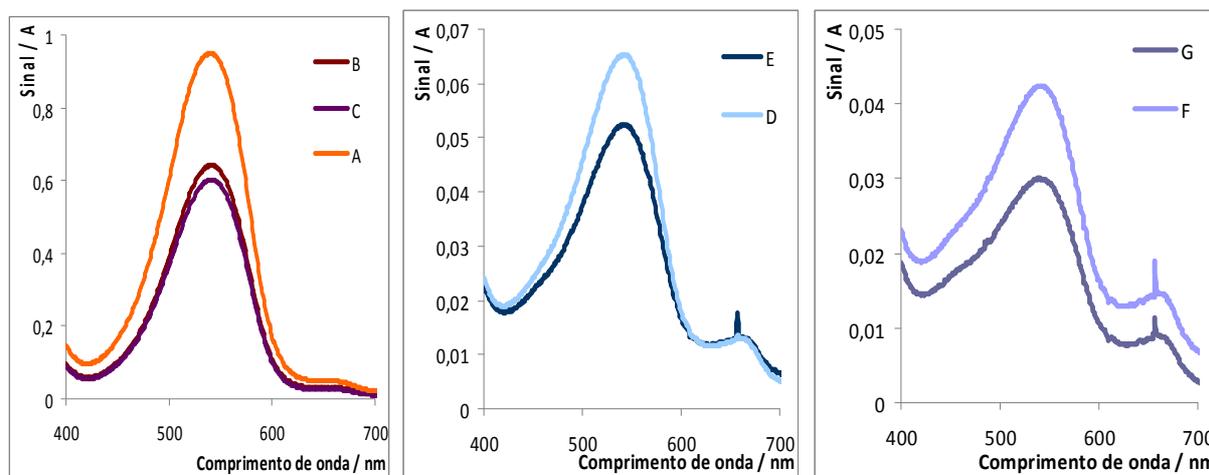
Para investigar a interferência do glifosato na derivatização, seja ela química ou fotoquímica, foram feitos testes em batelada com misturas de  $\text{NO}_2^-$  com glifosato submetidos à reação de Griess, e de NNG com glifosato submetidos à derivatização química e à fotoquímica paralelamente.

A Tabela 5 apresenta os resultados dos primeiros testes de interferência do glifosato. Soluções de  $\text{NO}_2^-$  a  $0,345 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas com solução padrão de glifosato a  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta mistura foi agitada por 5 minutos, sendo posteriormente adicionada solução de NED/SAM, e o produto levado a análise espectrofotométrica. Estes experimentos foram feitos em batelada, e não se nota diferença considerável nos sinais obtidos pela presença do glifosato, comparados com o mesmo procedimento utilizando solução padrão de  $\text{NO}_2^-$  em água.

**Tabela 5 – Resultados do experimento de verificação da interferência do glifosato na reação de Griess com nitrito.**

<b>Experimento</b>	<b>Absorbância média (máx. em 540nm)</b>	<b>Desvio padrão</b>
$\text{NO}_2^-$ (n=3)	0,0523	0,0007
$\text{NO}_2^-$ + Glifosato (n=3)	0,0538	0,0008

Posteriormente, foi avaliada a possível interferência do glifosato na derivatização química do NNG. Soluções padrão de NNG e de NNG misturado com glifosato foram submetidas a aquecimento a 95 °C por 15 minutos com adição de HCl a 4,5 mol L<sup>-1</sup>. Os experimentos foram feitos à exaustão de proporção crescente entre glifosato e NNG (NNG:Glifosato em 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000), buscando simular a condição da amostra. Todavia, na amostra real este descompasso de concentração é extremo, haja visto que se trata de produto técnico com teor de glifosato em torno de 95 % da massa total, para traços de NNG. Os resultados são apresentados na Figura 32, em que se nota interferência supressora do glifosato no resultado final da reação de Griess após derivatização química, em taxas de até 36 % de redução. Assim, conclui-se que o desempenho da derivatização química está sujeito à interferência do glifosato, o que se configura em uma desvantagem do método.



**Figura 32 – Espectros na região do visível de produtos da reação de Griess após derivatização química do NNG:** A) NNG em solução aquosa a 19,8 mg L<sup>-1</sup> ( $0,5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>); B) NNG em mistura aquosa com glifosato na proporção 1:1; C) NNG em mistura com glifosato na proporção 1:10; D) NNG em solução aquosa a 7,93 mg L<sup>-1</sup> ( $0,2 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>); E) NNG em mistura aquosa com glifosato na proporção 1:100; F) NNG em solução aquosa a 0,79 mg L<sup>-1</sup> ( $0,02 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>); G) NNG em mistura aquosa com glifosato na proporção 1:1000.

Nos experimentos com mistura de NNG e glifosato mencionados acima foi seguido o procedimento de adicionar a solução de NED/SAM antes do aquecimento. Em contraste, em testes com mistura de NNG e glifosato adicionados de HCl submetidas a aquecimento a 95 °C por 15 minutos, nos quais a solução de NED/SAM somente foi inserida posteriormente, não se observou formação de cor. Isto demonstra que o glifosato é capaz de impedir a formação de produto do NNG na reação de Griess. A adição de NED/SAM durante o aquecimento visa, portanto, coibir essa interferência, fazendo com que os íons nitrito oriundos do NNG derivatizado possam realizar a diazotização e conseguinte acoplamento, ao invés de serem recapturados pelo glifosato.

Em experimentos de derivatização química com amostras sólidas reais, pôde-se notar que a separação dos constituintes é fator crítico. Ao seguir o procedimento descrito por Kim *et al.*, excetuando-se no preparo a etapa de filtração em membrana de 0,45 µm, foram observados resultados desfavoráveis: mesmo amostras fortificadas com uma quantidade conhecida de NNG não tiveram, ao final de todo o processo, o resultado analítico esperado. Observou-se a geração de coloração azulada em amostras preparadas segundo tais procedimentos, durante o aquecimento em meio ácido, com a presença da solução de NED/SAM. Isto demonstra a formação de outro produto diferente do esperado, e que pode ter mascarado o NNG derivatizado. Há indícios, portanto, de que a composição da matriz interfere de alguma maneira na etapa de denitrosilação, e que pode se constituir em uma interferência espectrofotométrica supressora.

Dando continuidade à investigação de interferência, misturas de NNG com glifosato foram submetidas à derivatização fotoquímica. As soluções padrão foram expostas à radiação UV por 30 segundos, conforme resultados dos estudos de otimização da foto-reação, com posterior adição da solução de NED/SAM. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para ambos os tipos de derivatização. Observa-se que a fotoderivatização resulta em sinal analítico menos intenso do que a derivatização química, para as mesmas concentrações de NNG e de glifosato. Aparentemente, no

caso da derivatização química, o fato do reagente NED/SAM estar presente em solução durante o processo de clivagem suprime em certa medida a nitrosação do glifosato, o que não ocorre na fotoderivatização.

**Tabela 6 - Resultados do experimento de verificação da interferência do glifosato na reação de Griess com NNG em derivatização química e em derivatização fotoquímica.**

<b>Experimento</b>	<b>Absorbância média (max. 540nm)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>CV (%)</b>
NNG e Glif – Aquec. (n=3)	0,0438	0,0010	2,2
NNG e Glif – UV (n=3)	0,0339	0,0027	7,9

É possível que o radical nitrosil gerado da clivagem da ligação N-NO pela radiação UV interaja com as moléculas de glifosato em solução por reação de nitrosação. Diferentemente do procedimento para derivatização química, o reagente NED/SAM não está presente em solução no momento da denitrosilação, assim havendo um tempo de residência em que a nitrosação do glifosato pode ocorrer.

Em teoria, os íons nitrito podem ter efeito semelhante, porém estes são bem menos reativos do que o radical nitrosil, o que explica a diferença dos resultados obtidos com misturas de  $\text{NO}_2^-$  e glifosato.

Além da interferência ocasionada pelos componentes da matriz, outro problema enfrentado na aplicação real da análise em fluxo às amostras diz respeito à baixa concentração de NNG no extrato. De fato, para uma amostra que contenha o teor de NNG de  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ , teremos as seguintes estimativas, segundo procedimento de extração proposto pelo Bioagri Laboratórios:

- Se em 1000 g do produto técnico, há 1,0 mg de NNG, então em 1,5 g do produto técnico, há 0,0015 mg de NNG;
- Se a solubilidade do Glifosato em  $\text{H}_2\text{O}$  (em temperatura ambiente e em pH próximo de neutro) é de 10,5 g por litro, apenas 52,5 mg do produto técnico são solubilizados no volume de 5 mL;

- Considerando que a solubilidade do NNG em água seja semelhante à do Glifosato nas mesmas condições (embora tais dados não existam na literatura), pela quantidade presente na alíquota, ter-se-ia então 0,0525 µg de NNG solubilizados no volume de 5 mL. Em termos de concentração, este valor corresponde a 0,0105 mg L<sup>-1</sup>.

Com esta estimativa, observa-se que 4 ações são fundamentais para a eficácia do método:

- I. Maximizar ou incrementar a conversão pela eficiência da fotoderivatização ;
- II. Eliminar ou minimizar a interferência negativa do Glifosato;
- III. Eliminar ou minimizar o efeito Schlieren provocado pelos demais componentes da amostra;
- IV. Adotar mecanismo de pré-concentração no preparo da amostra.

Para alcançar estes objetivos, a estratégia de extração em fase sólida foi cogitada, considerando sua possibilidade de acoplamento ao FIA, e colocada em teste.

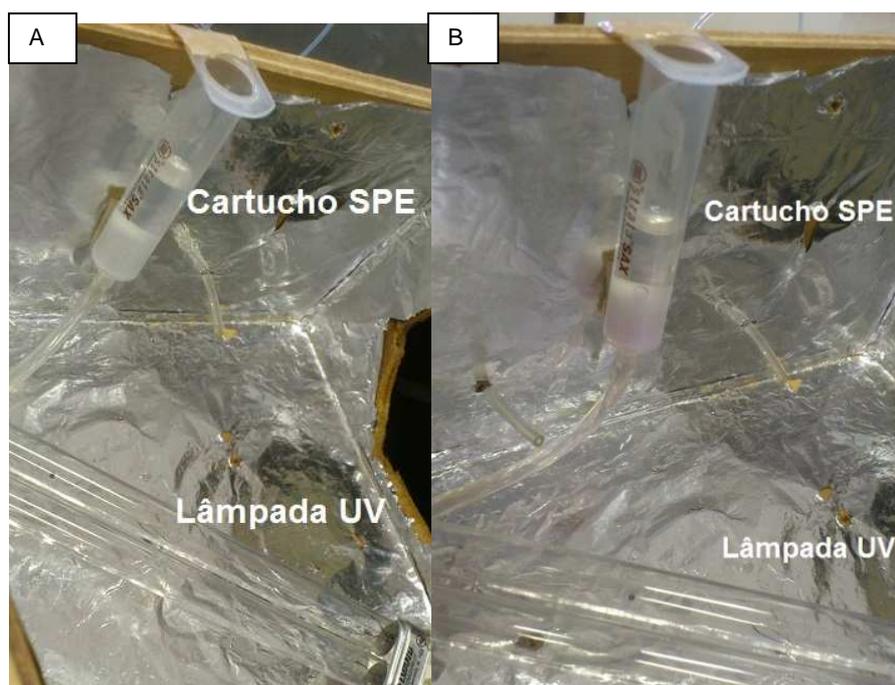
#### **4.2.5. Experimentos com SPE simultâneo à fotoderivatização**

Um obstáculo à execução da fotoderivatização em fluxo persistiu no fato de glifosato recapturar os radicais nitrosil produzindo novas moléculas íntegras de NNG, por mais curto que seja o tempo entre a foto-reação e a inserção do reagente de Griess. A utilização de extração em fase sólida de troca aniônica para retenção dos íons nitrito foi a solução encontrada para minimização desta interferência. Considerando que, em meio ácido, tanto glifosato como NNG estão completamente protonados, estas espécies não são retidas na fase sólida de troca aniônica. A espécie nitrito produzida pela clivagem fotolítica do NNG, em contrapartida, pode ser retida pelas terminações de amônio quaternário da fase sólida.

Entretanto, havia ainda o problema do tempo de residência em que estas espécies interagem com as moléculas de glifosato desde a fotoderivatização até

chegar à fase sólida. Para contornar isto, optou-se por realizar ambos os processos simultaneamente, colocando o cartucho de SPE dentro do foto-reator.

Em testes iniciais, a fase sólida foi ativada com uma solução de acetonitrila e água deionizada. A solução padrão de NNG foi inserida no cartucho e permaneceu exposta à radiação UV por poucos minutos, até ser succionada pela bomba peristáltica em vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Posteriormente, o reagente de Griess foi inserido no cartucho para atuar como eluente. A Figura 33 mostra o cartucho de SPE com o NNG fotoderivatizado, antes e durante a eluição com o reagente de Griess. Pode-se observar que o experimento foi bem sucedido, como se pode ver pela formação de cor rósea no corpo da fase sólida. Isto é, íons nitrito oriundos da fotoderivatização do NNG de fato foram retidos pela fase sólida, e a reação pôde se processar como esperado. O eluato teve coloração rosa, demonstrando que o reagente de Griess reagiu com os íons nitrito e o produto dessa reação foi liberado da coluna.



**Figura 33 – A) cartucho SPE com solução padrão de NNG após fotoderivatização; B) produto colorido formado a partir da eluição da espécie derivatizada retida com reagente de Griess.**

Para verificar se alguma porção dos íons nitrito oriundos da fotoderivatização do NNG teriam passado livremente pelo cartucho, a solução de amostra percolada foi

misturada com reagente de Griess. A mistura manteve-se incolor, comprovando que todo o nitrito produto da fotoderivatização foi retido no cartucho.

Para a avaliação da seletividade da fase sólida, uma mistura de soluções padrão de glifosato e NNG foi inserida no cartucho passando pela coluna, sendo então adicionado ao percolado um reagente colorimétrico específico para glifosato, qual seja, p-dimetilaminocinamaldeído (p-DAC). A mistura adquiriu coloração alaranjada intensa, demonstrando que pelo menos a maior parte do glifosato não fora retido na fase sólida. Tais evidências confirmaram as premissas do experimento, demonstrando que NNG e glifosato não sofrem interação com a coluna de troca aniônica.

Estes experimentos demonstraram que com a extração em fase sólida é possível:

- I. Pré-concentrar o produto da derivatização do analito em duas instâncias: i) pela retenção de íons nitrito durante a passagem da amostra em fluxo constante acompanhada da fotoderivatização; e ii) pela possibilidade de eluir esses íons com uma solução de NED/SAM de menor volume;
- II. Suprimir a interferência do glifosato e outros componentes da matriz, uma vez que não interagem com a fase sólida;
- III. Acelerar o processo como um todo, já que as etapas de limpeza da amostra e fotoderivatização podem ser executadas simultaneamente;

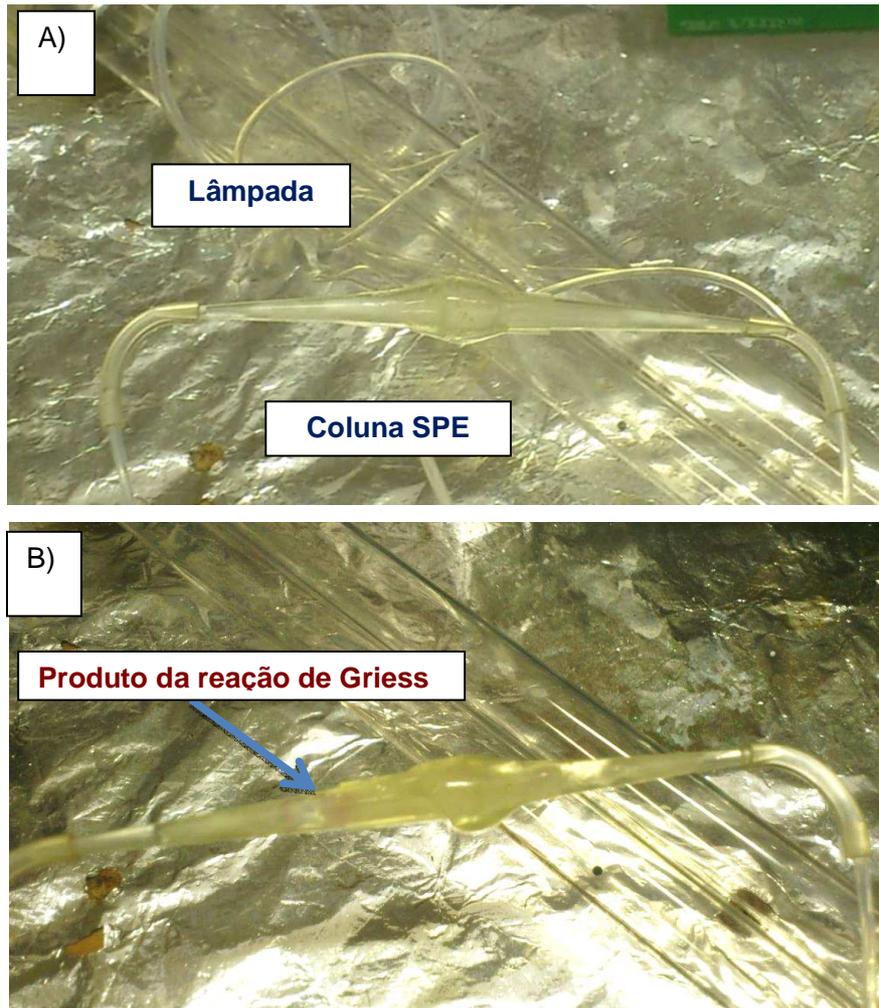
Com isto, foram iniciados os experimentos de acoplamento da extração em fase sólida ao sistema de fluxo, combinada com a etapa de fotoderivatização.

#### **4.2.5.1. Montagem da coluna de SPE em linha**

A Figura 34 mostra a coluna de extração em fase sólida em linha, construída conforme esquematizado na Figura 14 e acoplada ao sistema FIA no interior do fotoreator. Foram utilizadas duas ponteiros de micropipetas de 10-100  $\mu\text{L}$ , cujas extremidades foram recheadas com lã de vidro. Cerca de 80 mg da fase sólida de amônio quaternário do cartucho SPE Strata-SAX foram inseridos nas ponteiros, e suas partes largas coladas com uma resina. Esta célula se mostrou transparente à radiação

UV e substituiu, portanto, a alça de amostragem de 50 cm usada no sistema anterior para expor a solução de amostra à radiação UV.

Pode-se observar na Figura 34-B que o método em fluxo demonstrou eficiência, pela percepção de coloração rósea. Este produto é eluído pelo próprio reagente de Griess e direcionado ao detector. Assim, elimina-se um fator de diluição que haveria em uma mistura posterior no FIA.



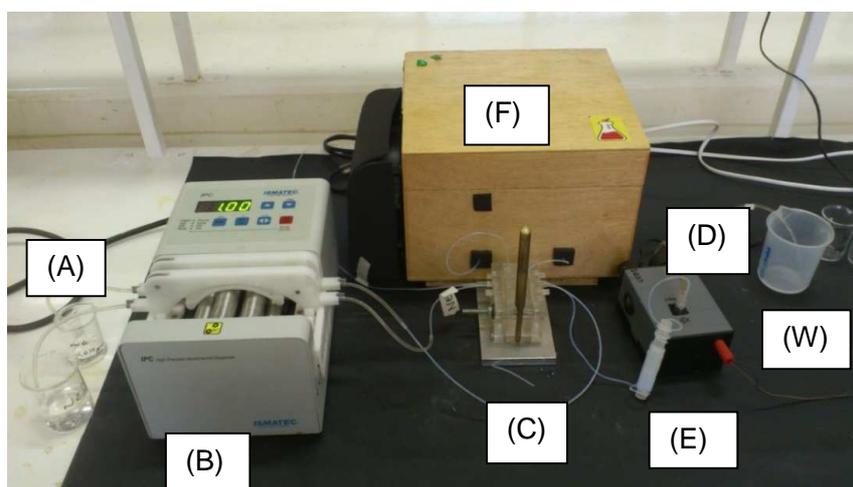
**Figura 34 – A) Coluna de extração em fase sólida em fluxo antes da utilização; B) produto colorido durante eluição com reagente de Griess.**

Não foi encontrado na literatura nenhum artigo que utilizasse a fotoderivatização simultaneamente à retenção da espécie derivatizada na fase sólida. Esta estratégia se mostrou adequada ao NNG, portanto pode ser estendida a outras N-nitrosaminas. Esta é, portanto, mais uma contribuição inovadora deste trabalho.

#### 4.2.5.2. Estudo dos parâmetros do método no sistema com fotoderivatização e SPE combinados em linha

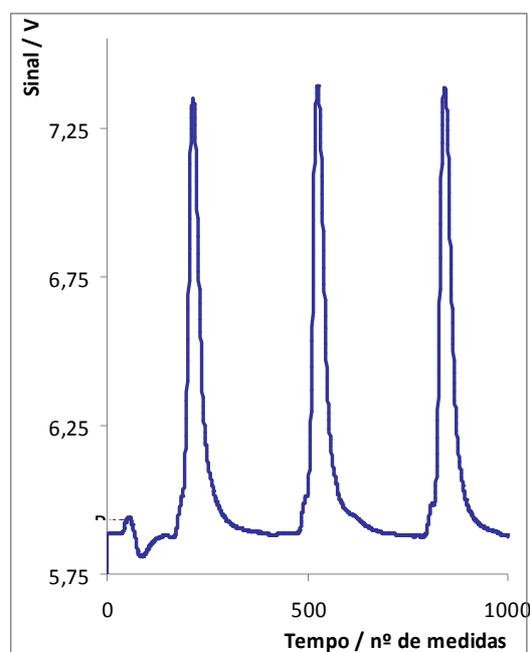
O sistema FIA foi montado conforme esquema apresentado na Figura 13, contemplando um injetor comutador, o foto-reator, uma bobina para mistura da amostra derivatizada com o reagente de Griess e uma bomba peristáltica para impulsionar todas as soluções envolvidas. Este sistema foi preparado visando a inclusão de uma etapa de extração para minimizar ou suprimir os efeitos interferentes dos componentes da matriz, especialmente o glifosato.

A Figura 35 mostra o sistema montado, no qual as soluções de amostra e de NED/SAM eram bombeadas continuamente, passando pelo injetor comutador. Na posição de amostragem, a solução da amostra passava pelo foto-reator e pela coluna de troca iônica, enquanto a solução de NED/SAM seguia até o detector. Quando acionada a posição de injeção, o fluxo de NED/SAM era desviado para o caminho do SPE e do foto-reator, onde impulsionava o segmento do produto da reação de Griess até a bobina reacional e, por fim, ao detector. Uma observação importante é a de que a solução de NED/SAM se degrada rapidamente quando exposta à radiação UV, tornando necessário desligar a lâmpada quando da injeção do reagente na coluna.



**Figura 35 – sistema de análise por injeção em fluxo com: (A) soluções de amostra e reagente de Griess; (B) bomba peristáltica; (C) injetor comutador; (D) detector; (E) bobina reacional; (F) foto-reator com coluna de SPE em linha em seu interior e (W) descarte.**

O sistema em fluxo foi testado com soluções padrão de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta solução era mantida fluindo pela coluna de SPE em linha com o injetor comutador na posição de amostragem. Isto foi feito por 5 minutos com a lâmpada UV ligada. Após esse período, o injetor foi colocado na posição de injeção e a solução de NED/SAM foi direcionada coluna de SPE para reação com os íons nitrito ali retidos. A reação de Griess se deu, portanto, na fase sólida, e o produto colorido seguiu em direção ao detector. A Figura 36 apresenta os sinais analíticos obtidos por este método. É possível observar um sinal muito intenso, comprovando a pré-concentração da espécie derivatizada, e igualmente repetitivo. Foi possível obter sinais na faixa de 1,45 V, bem maiores do que os 200 mV obtidos do sistema em multicomutação e os 260 mV obtidos pelo monosegmentado. Os perfis de pico são bem definidos e mostram rápida limpeza.



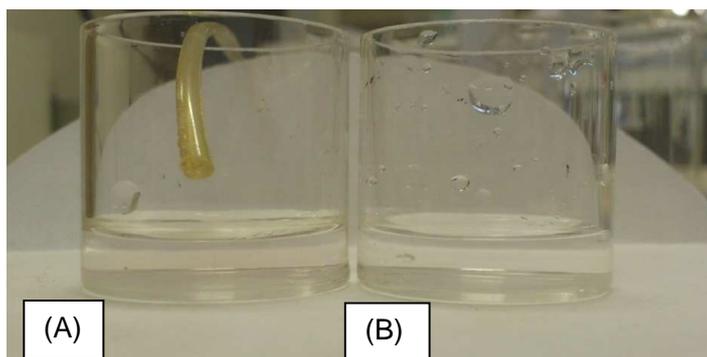
**Figura 36 – Registro dos sinais analíticos de solução padrão de NNG a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  em FIA com SPE e fotoderivatização simultâneos, após eluição com reagente de Griess.** Condições: Vazão =  $0,750 \text{ mL min}^{-1}$ , potência da lâmpada = 11 W, tempo de exposição = 5 min, Fase sólida = troca aniônica (amônio quaternário).

Estes resultados são promissores, ainda mais considerando que não foi colocada aqui uma etapa de lavagem do SPE entre uma leitura e outra.

#### 4.2.5.3. Testes com amostras reais

Amostras de produto técnico sólido de glifosato foram testadas no sistema em fluxo na configuração descrita acima. Estas foram preparadas conforme procedimento de Bioagri Laboratórios.<sup>64</sup> A única alteração feita foi a substituição da etapa de filtração pela centrifugação das suspensões de amostra, uma vez que havia muita perda de solução e, conseqüentemente, de analitos. A centrifugação foi realizada em 5 minutos a 2500 rpm.

Amostras não fortificadas foram processadas no sistema em fluxo previamente otimizado com SPE em linha. A Figura 37 mostra a solução eluída após SPE (B), em comparação com alíquota não processada da amostra (A). Nota-se a leve coloração rósea da solução final coletada, mesmo tendo em conta a concentração ínfima de NNG na amostra (relatada como  $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$  pelo método de referência).



**Figura 37 – (A): solução final da análise de uma amostra de produto técnico de Glifosato não fortificada, submetida ao sistema de análise em fluxo com extração em fase sólida e fotoderivatização em linha; e (B): extrato da amostra antes da corrida analítica.**

Não foi possível obter um sinal analítico da amostra pela ocorrência de efeito Schlieren, possivelmente ocasionado pela diferença de concentração na interface fluídica entre o produto formado e os componentes da matriz que não foram retidos no SPE. Para solucionar este problema, a inclusão de uma etapa de lavagem do SPE antes da eluição seria necessária, o que removeria todo o excedente de matriz, interpondo-se no fluxo uma seção de água deionizada entre o que restou da matriz e o produto da reação de Griess. A solução de lavagem pode ser encaminhada

diretamente para o descarte, sem passar pelo detector. Para isto, um arranjo incluindo uma válvula solenoide após a passagem pelo SPE se mostra plausível e de simples aplicação. Problemas pontuais como este podem ser solucionados com um aperfeiçoamento do sistema em fluxo, de maneira a torná-lo mais robusto e mais eficiente.

O sistema proposto apresentou resultados promissores para o propósito almejado. Alguns parâmetros devem ser avaliados para otimização de suas condições operacionais, especialmente naquilo que diz respeito à etapa de extração em fase sólida. É conveniente que fatores como quantidade de fase sólida na montagem da célula, vazão de eluição e eficiência de extração, bem como a vida útil dos cartuchos, sejam avaliados objetivamente, estudos que não puderam ser concluídos neste trabalho pela escassez de tempo para tal. Ações futuras de pesquisa devem ser empreendidas, mas fica claro que o objetivo estabelecido foi alcançado, mesmo que com resultados qualitativos no teste com amostras reais, restando portanto um refinamento nos procedimentos.

## ***5. Conclusões e Perspectivas***

## ***Conclusões e Perspectivas***

Os experimentos mostraram que o desenvolvimento de um método de determinação fotométrica de NNG em amostras de produto técnico de Glifosato por sistema de análises por injeção em fluxo é factível. A adoção de derivatização fotoquímica se mostrou adequada ao propósito, bem como a etapa de extração em fase sólida em fluxo. Ambas são etapas de montagem simples e que trazem benefícios em termos de agilidade, simplicidade de operação, sensibilidade e reprodutibilidade.

Ficou claro que, aplicando-se a fotoderivatização, é possível realizar o ensaio em menos tempo e com economia de reagentes, uma vez que apenas 30 segundos de exposição da amostra foram suficientes para retornar um resultado quantificável e reprodutível, além de não ser requerida alta concentração de ácido como no método convencional. Uma lâmpada de potência intermediária foi suficiente para promover a clivagem da ligação N-NO, além de possuir facilidades de manuseio por seu tamanho, formato, ausência de geração de ozônio como efeito colateral e estar disponível comercialmente a custos mais baixos do que o de certos reagentes. Sua utilização minimiza também a periculosidade dos descartes. O tempo de vida útil da lâmpada declarado pelo próprio fabricante é bastante longo, o que minimiza preocupações em termos de reposição.

A inclusão de uma etapa de extração em fase sólida em linha foi ponto chave na busca por seletividade do método, já que solucionava de maneira simples problemas como a baixa concentração do analito na amostra e a remoção de interferentes presentes na matriz, tanto relacionados à leitura fotométrica (causadores de efeito Schlieren), como à reação de Griess (glifosato). A aplicação do SPE em linha, no entanto, requer uma pesquisa mais apurada para definição de parâmetros ótimos de funcionamento, especialmente em relação à quantidade de fase sólida, otimização das etapas de condicionamento, amostragem, lavagem e eluição, além de vazão do fluxo, composição das soluções, e vida útil da coluna. A adoção desta etapa de maneira simultânea à radiação UV mostrou-se eficaz na medida em que eliminou o problema encontrado pela presença em grande escala do glifosato, sendo ainda de caráter

inovador, uma vez que não foram encontrados trabalhos na literatura científica com tal procedimento.

O sistema de análise por injeção em fluxo mostrou-se plausível em todos os formatos estudados, tanto o de arranjo mais simples como o mais complexo: multicomutação com válvulas, monosegmentado e com injetor comutador. Este último, embora mais simples e semi-automatizado, abre possibilidades reais para um avanço técnico no sentido de se realizar análises mais rápidas, mais reprodutíveis e com menos interferência humana do que os procedimentos correntes.

O dispositivo de detecção baseado em LED mostrou-se adequado ao propósito, provendo respostas analíticas claras mesmo em baixas concentrações de analito. O dispositivo é robusto, passível de fácil automação e responde especificamente para o produto reacional obtido.

Os resultados aqui descritos servem de fundamentos para a definição de parâmetros de otimização do sistema como um todo e validação do método em trabalhos futuros. O desenvolvimento completo do método proposto encontrou percalços ao longo da pesquisa, o que demandaria mais tempo para sua completude. Um estudo mais refinado do comportamento do método com todas as suas etapas seguindo normativas já existentes e a aplicação a amostras reais são fundamentais para sua implementação em rotina, e estes resultados não são mais tão distantes ao se considerar os trabalhos aqui realizados.

Além disso, esta abordagem abre espaço para atendimento a outras demandas regulatórias similares. A INC nº 2/2008 lista ainda uma série de agrotóxicos cujas impurezas impõem riscos conhecidos à saúde e são alvo de controle e fiscalização, sendo muitas delas N-nitrosaminas assim como o NNG.<sup>25</sup> A Tabela 7 apresenta parte do anexo desta Instrução Normativa, enfatizando as impurezas toxicologicamente relevantes pertencentes à família das N-nitrosaminas em diversos ingredientes ativos, bem como os respectivos limites regulatórios. Todas essas substâncias podem, a princípio, ser monitoradas por métodos baseados no procedimento aqui estudado.

**Tabela 7 – Relação de outras impurezas pertencentes à família das N-nitrosaminas, em agrotóxicos regulados. Adaptado da INC nº 2/2008.**

<b>Código Monografia ANVISA</b>	<b>Ingrediente Ativo</b>	<b>Impureza (apenas N-nitrosaminas)</b>	<b>Limite regulatório</b>
A11	Ametrina	Nitrosaminas na forma de N-nitrosoametrina	0,5 mg kg <sup>-1</sup>
A14	Atrazina	Nitrosaminasna forma de N-nitrosoatrazina	0,5 mg kg <sup>-1</sup>
B25	Butralina	N-nitrosodimetilpropilamina e N-nitrosobutralina	0,5 mg kg <sup>-1</sup> e 1,0 mg kg <sup>-1</sup>
D34	Daminozida	Nitrosaminas na forma de N-nitrosodimetilamina	2,0 mg kg <sup>-1</sup>
F38	Flumetralina	Nitrosaminas totais	1,0 mg kg <sup>-1</sup>
G01	Glifosato	N-nitrosoglifosato	1,0 mg kg <sup>-1</sup>
O04	Orizalina	N-nitroso-di-n-propilamina	0,5 mg kg <sup>-1</sup>
O10	Oxifluorfem	N-nitrosodimetilamina	2,0 mg kg <sup>-1</sup>
P05	Pendimentalina	N-nitrosodietilpropilamina e N-nitrosopendimentalina	0,5 mg kg <sup>-1</sup> e 60,0 mg kg <sup>-1</sup>
S03	Simazina	Nitrosaminas na forma de N-nitrososimazina	0,5 mg kg <sup>-1</sup>
T24	Trifluralina	N-nitroso-di-n-propilamina	1,0 mg kg <sup>-1</sup>

Esta informação abre um potencial interessante para métodos analíticos de determinação de N-nitrosaminas, na medida em que o mesmo princípio pode ser, segundo estudos adequados, estendido para os diversos produtos alvo de tal regulação.

A adoção de estratégia analítica por FIA vem ao encontro das necessidades dos organismos reguladores, na medida em que trazem consigo rapidez ao ensaio e confiabilidade dos resultados por um custo muito mais baixo do que certas técnicas instrumentais.

Ainda quanto ao FIA, é importante frisar que se trata de uma técnica cujos primórdios remontam às publicações de 1975, e que merece uma atenção especial de todos aqueles envolvidos em análises químicas principalmente por dois fatos: i) ter possibilitado uma nova forma de conduzir ensaios químicos, muitos dos quais ainda são feitos como foram concebidos no século XIX;<sup>46</sup> e ii) possuir suas raízes de desenvolvimento no Brasil.

O desenvolvimento deste método traz consigo considerável carga de inovação, e é oportuno, não só para o atendimento às necessidades dos organismos de regulação, como também para a evolução dos sistemas de análise em fluxo, na expansão de suas aplicações e na própria abertura de possibilidades, formas e etapas associadas à análise em si.

## ***6. Referências***

## Referências

- <sup>1</sup> <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, acessado em agosto de 2013.
- <sup>2</sup> <http://en.mercopress.com/2009/04/18/brazilian-agriculture-worlds-top-consumers-of-pesticides>, acessado em agosto de 2013.
- <sup>3</sup> Market estimates, EPA UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, *Pesticides Industry Sales and Usage, 2006 and 2007 Market Estimates*, 2011.
- <sup>4</sup> Tu, M., Hurd, C., Robison, R., Randall, J. M.; Glyphosate, *Weed Control Methods Handbook*, The Nature Conservancy, 7e.1, 2001.
- <sup>5</sup> Amarante Junior, O. P.; dos Santos, T.C.R.; Brito, N. M.; Ribeiro, M. L.; *Quim. Nova*, **2002**, Vol. 25, No. 4, 589.
- <sup>6</sup> BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Monografia de Agrotóxico G01, RE Nº 4452 de 2010. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6e400500474594899c26dc3fbc4c6735/G01.pdf?MOD=AJPERES>>. Acessado em outubro de 2013.
- <sup>7</sup> AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 12 ago. 2013.
- <sup>8</sup> ALICEWEB2, Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet, Secretaria de Comércio Exterior, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em <<http://aliceweb2.mdic.gov.br/>> Acesso em 12 ago. 2013.
- <sup>9</sup> SISLEGIS, Sistema de Consulta à Legislação, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/>> Acesso em 12 ago. 2013.
- <sup>10</sup> EUROPEAN COMMISSION. Health & Consumer Protection Directorate-General, Commission Working Document, Review report for the active substance glyphosate, 21 jan. **2002**, Official Journal. Disponível em < [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1\\_glyphosate\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1_glyphosate_en.pdf)> Acesso em: 06 out. 2013.
- <sup>11</sup> FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO Specifications and Evaluations for Plant Protection Products, GLYPHOSATE N-(phosphonomethyl)glycine, **2000/2001**. Disponível em < [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Specs/glypho01.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/glypho01.pdf)> Acesso em: 06 out. 2013.
- <sup>12</sup> UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Prevention, Pesticides And Toxic Substances (7508W), R.E.D. Facts Glyphosate, EPA **1993**. Disponível em < <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0178fact.pdf>> Acesso em: 06 out. 2013.
- <sup>13</sup> Heck, G. R.; Armstrong, C. L.; Astwood, J. D.; Behr, C. F.; Bookout, J. T.; Brown, S. M.; Cavato, T. A.; Deboer, D. L.; *Crop Science* **2005**, 45, 329.

- 
- <sup>14</sup> Funke, T.; Huijiong, H.; Healy-Fried, M. L.; Fischer, M.; Schönbrunn, E.;. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (35), 13010.
- <sup>15</sup> Boerboom, C.; Owen, M.; Facts about Glyphosate Resistant Weeds, The Glyphosate, Weeds an Crop Series GWC-1, Diponível em <<http://weeds.missouri.edu/publications/gwc-1.pdf>> Acesso em: 06 out. 2013.
- <sup>16</sup> Botta, F.; Lavison, G.; Couturier, G.; Alliot, F.; Moreau-Guigon, E.; Fauchon, N.; Guery, B.; Chevreuil, M.; *Chemosphere* **2009**, *77* (1), 133.
- <sup>17</sup> <http://www.wageningenur.nl/en/Research-Results/Projects-and-programmes/SWEEP.htm>, acessado em agosto de 2013.
- <sup>18</sup> Al Deen, T. S.; Hibbert, D. B.; Hook, J. M.; Wellsc, R. J.; *Analytica Chimica Acta* **2002**, *474*, 125.
- <sup>19</sup> Ambrus, A.; Hamilton, D. J.; Kuiper, H. A.; Racke, K. D.; *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 937.
- <sup>20</sup> BROWN, S. **Synthesis and Activity of Commercially Available Herbicides**. [S.l.], 2006. Disponível em: <[http://www.bama.ua.edu/~chem/seminars/student\\_seminars/spring06/papers-s06/brown-sem.pdf](http://www.bama.ua.edu/~chem/seminars/student_seminars/spring06/papers-s06/brown-sem.pdf)>. Acessado em junho de 2009.
- <sup>21</sup> UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Glyphosate – Review and Evaluation of TOX data (1) Roundup operator exposure and re-entry data on glyphosate and N-nitrosoglyphosate and (2) Two-part study on animal metabolism of N-nitrosoglyphosate, USEPA 1978. Disponível em < [http://www.epa.gov/pesticides/chem\\_search/cleared\\_reviews/csr\\_PC-103601\\_26-Sep-78\\_067.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-103601_26-Sep-78_067.pdf) > Acesso em 06 out. 2013.
- <sup>22</sup> Bartsch, H.; Ohshima, H.; Pignatelli, B.; Calmels, S.; *Pharmacogenetics* **1992**, *2*, 272.
- <sup>23</sup> <http://www.examiner.com/article/the-link-between-alzheimer-s-disease-and-nitrosamines-it-s-your-food>, acessado em julho de 2013
- <sup>24</sup> <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/nitrosamine.html>, acessado em julho de 2013.
- <sup>25</sup> BRASIL. Instrução Normativa Conjunta Nº 2, de 20 de junho de **2008**, Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 jun. 2008. Seção 1, p. 4.
- <sup>26</sup> Brønstad, J. O.; Friestad, H. O.; *Analyst* **1976**, *101*, 820.
- <sup>27</sup> de Souza, A. P.; Prates, H. T.; Ferreira, F. A.; Reis, E. L.; Jordão, C. P.; *Planta Daninha* **1999**, *vol. 17 no. 2*, 245.
- <sup>28</sup> Teófilo, R. F.; Reis, E. L.; Reis, C.; da Silva, G. A.; Kubota, L. T.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *vol. 15 no. 6*, 865.
- <sup>29</sup> Pastore, P.; Lavagnini, I.; Boaretto, A.; Magno, F.; *Analytica Chimica Acta* **1990**, *230*, 29.
- <sup>30</sup> Harris, D. C.; in *Análise Química Quantitativa*; LTC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2008.

- 
- <sup>31</sup> Lores, M.; Cabaleiro, O.; Cela, R.; *Trends in Analytical Chemistry* **1999**, vol. 18, no. 6, 392.
- <sup>32</sup> Ohta, T.; Goto, N.; Takitani, S.; *Analyst* **1988**, vol. 113, 1333.
- <sup>33</sup> Wang, X.; Gao, Y.; Xu, X.; Zhao, J.; Song, G.; Hu, Y.; *Chromatographia* **2011**, Vol. 73, Is. 3-4, 321
- <sup>34</sup> Kataoka, H.; Shindoh, S.; Makita, M.; *Journal of chromatography A* **1996**, 723:1, 93
- <sup>35</sup> Monsanto Agricultural Products Company, *Standard Analytical Method N° AQC-684-86*, 1986.
- <sup>36</sup> Monsanto Agricultural Products Company, *Standard Analytical Method N° AQC-1140E*, 2011.
- <sup>37</sup> Schulz, K.; Kerber, S.; Kelm, M.; *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **1999**, vol. 3 no. 3, 225.
- <sup>38</sup> Pasquali, C. E. L.; Gallego-Picó, A.; Hernando, P. F.; Velasco, M.; Alegía, J. S. D.; *Microchemical Journal* **2010**, 94, 79.
- <sup>39</sup> Engelhardt, H.; Meister, J.; Kolla, P.; *Chromatographia* **1993**, vol. 35 no. 1/2, 5.
- <sup>40</sup> Patton C. J.; Kryskalla, J. R.; *U.S. Geological Survey Techniques and Methods*, b. 5, cap. B8, 34 p.
- <sup>41</sup> Kim, M.; Stripeikis, J.; Iñón, F.; Tudino, M.; *Talanta* **2007**, 72, 1054.
- <sup>42</sup> Young, J. C.; Khan, S. U.; Marriage, P. B.; *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25 (4), 918.
- <sup>43</sup> Chow, Y. L.; in *The Chemistry of Functional Groups Supplement F: The Chemistry of amino, nitroso and nitro compounds and their derivatives*, Patai, S. ed.; John Wiley & Sons, Binghamton, USA, 1982, vol. 1, cap. VIII.
- <sup>44</sup> Lee, C.; Choi, W.; Yoon, J.; *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39(24), 9702.
- <sup>45</sup> Chow, Y. L.; *Acc. Chem. Res.*, **1973**, 6 (10), 354.
- <sup>46</sup> Hansen, E. H.; *Comprehensive Analytical Chemistry: Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, Kolev, S. D., McKelvie, I. D., eds.; Elsevier, Amsterdam, Holanda, 2008, vol. 54, cap. 1.
- <sup>47</sup> Cassella, R.J.; Cassella, A.R.; Garrigues, S.; Santelli, R.E.; Campos, R.C.; de la Guardia, M.; *Analyst* **2000**, 125, 1829.
- <sup>48</sup> Khan, S.; Tubino, M.; Vila, M. M. D. C.; Olaf, E.; Rodrigues, T.C.; da Silva, M. P.; *Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Conference on Heavy Metals in the Environment*, DOI: 10.1051/e3sconf20130109007
- <sup>49</sup> Jurado-Sánchez, B.; Ballesteros, E.; Gallego, M.; *Talanta* **2007**, 73, 498.
- <sup>50</sup> Yu, Y-L.; Jiang Y.; Chen, M-L.; Wang, J-H.; *Trends in Analytical Chemistry*, **2011**, Vol. 30, No. 10, 1649.

- 
- <sup>51</sup> Dias, A.C.B. , Fonseca, A., Sodré, F.F. Automação do Preparo de Amostras em Sistemas de Análises em Fluxo. Cap. 20. In: *PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS*, 2014 1ª Edição. Editora: LTC, Rio de Janeiro, *in press*.
- <sup>52</sup> Lara, F. J.; García-Campaña, A. M.; Aaron, J. J.; *Analytica Chimica Acta* **2010**, 679 17.
- <sup>53</sup> Benito, C. G.; Sancho, T. G.; Calatayud, J. M.; *Analytica Chimica Acta* **1993**, 279, 293.
- <sup>54</sup> Chen, H.; Zhu, J.; Cao, X.; Fang, Q.; *Analyst* **1998**, 123, 1017.
- <sup>55</sup> David, V.; Saèz, R. M. M.; Mateo, J. V. G.; Calatayud, J. M.; *Analyst* **2000**, 122, 1313.
- <sup>56</sup> Luque-Pérez, E.; Ríos, A., Valcárcel, M.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, 371, 891.
- <sup>57</sup> Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Martín, J.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 541, 69.
- <sup>58</sup> *Microsoft Visual Studio 6.0*, Microsoft, 1998.
- <sup>59</sup> Fonseca, A.; Raimundo Jr, I.; *Analytica Chimica Acta* **2004**, 522, 223
- <sup>60</sup> Ivanov, V. M.; *Journal of Analytical Chemistry*, **2004**, Vol. 59, No. 10, 1002
- <sup>61</sup> Ayala, A.; Leal, O. L.; Ferrer, L.; Cerdá, V.; *Microchemical Journal* **2012**, 100, 55
- <sup>62</sup> Jannasch, H. W.; Johnson, K. S.; Sakamoto, C. M.; *Anal. Chem.*, **1994**, 66 (20), 3352
- <sup>63</sup> Giné, M. F.; Reis, B. F.; Zagatto, E.A.G.; Krug, F. J.; Jacintho, A. O.; *Analytica Chimica Acta* **1983**, 155, 131
- <sup>64</sup> Bioagri Laboratórios Ltda., *POP M-1894 rev. 02*
- <sup>65</sup> Da Silva, A. S.; Pezza, L.; Pezza, H. R.; *Quím. Nova*, **2012**, Vol. 35, No. 1, 114
- <sup>66</sup> MICHIGAN STATE UNIVERSITY. Photochemistry. Disponível em:<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/photchem.htm> Acessado em janeiro de 2013
- <sup>67</sup> Menzel, D.B.; *J Toxicol Environ Health*, **1984**; 13(2-3),183.
- <sup>68</sup> [www.iar.unicamp.br/lab/luz/ld/Lâmpadas/Fontes\\_Lumin.pdf](http://www.iar.unicamp.br/lab/luz/ld/Lâmpadas/Fontes_Lumin.pdf), acessado em dezembro de 2012
- <sup>69</sup> Smith, W.; *Principles of Ozone Generation*, Watertec Engineering Pty, Australia,
- <sup>70</sup> Milis, A.; Domènech, X.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **1993**, Vol. 72, Is. 1, 55
- <sup>71</sup> Oliver C. Zafiriou, O. C.; Mary B. True, M. B.; *Geophysical Research Letters*, **1979**, Vol. 6, Is. 2, 81
- <sup>72</sup> Dias, A. C. B.; Borges, E. P.; Zagatto, E. A. G.; Worsfold, P J.; *Talanta*, **2006**, 68,1076